

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»

На правах рукописи

Смаглий Людмила Вячеславовна

**РОЛЬ СЕРОВОДОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК**

03.03.01 – физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор **М.Б. БАСКАКОВ**

ТОМСК – 2013

Список принятых сокращений

АДФ - аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АЦ – аденилатциклаза

ГМ – гладкие мышцы

ГМК – гладкомышечные клетки

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДАГ - диацилглицерол

ИТФ - инозитолтрифосфат

K^+ _{АТФ}-каналы – АТФ – чувствительные калиевые каналы

K^+ _{Ca²⁺}-каналы – кальций – активируемые калиевые каналы

K^+ _v – каналы – потенциал-зависимые калиевые каналы

КЛЦМ – киназа легких цепей миозина

КМ – кальмодулин

ЛЦМ – легкие цепи миозина

МН – механическое напряжение

МХ - митохондрии

НАДФ – никотинамиддинуклеотид фосфат

ПК-А – протеинкиназа А

ПК-Г – протеинкиназа G

Ca²⁺-КМ – кальций-кальмодулиновый комплекс

СГМ – сосудистые гладкие мышцы

СГМК – сосудистые гладкомышечные клетки

СПР – саркоплазматический ретикулум

ТЭА – тетраэтиламмония хлорид

ФЭ – фенилэфрин

цАМФ – циклический 3:5-аденозинмонофосфат

цГМФ - циклический 3:5-гуанозинмонофосфат

ВК_{Ca} – кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости

3MST - 3-меркаптопируват-сульфуртрансфераза

CAT – цистеин-аминотрансфераза

CBS - цистотионин-β-синтаза

CO – монооксид углерода

CSE - цистотионин-γ-лиаза

EDHF – эндотелиальный гиперполяризующий фактор

eNOS – эндотелиальная NO - синтаза

H₂S – сероводород (сульфид водорода)

IK_{Ca} – кальций – активируемые калиевые каналы промежуточной

проводимости

JNK - c-Jun-NH₂-терминальная протеинкиназа

NaHS – гидросульфид натрия

NO – оксид азота

P38 MAPK – митоген- активируемая протеинкиназа p 38

ppm – parts per million - одна миллионная часть

SK_{Ca} – кальций – активируемые калиевые каналы малой проводимости

Содержание

Список принятых сокращений	2
Содержание	4
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА I.....	14
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
<i>1.1 Структурная организация гладкомышечных клеток</i>	<i>14</i>
<i>1.2. Организация внутриклеточных сигнальных систем в регуляции сократительной активности гладких мышц сосудов</i>	<i>18</i>
<i>1.3. Ионные механизмы регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток.....</i>	<i>23</i>
<i>1.4. Физико-химические свойства сероводорода</i>	<i>31</i>
<i>1.5. Токсические свойства сероводорода.....</i>	<i>31</i>
<i>1.6. Пути метаболизма сероводорода в организме</i>	<i>33</i>
<i>1.7. Роль сероводорода в регуляции физиологических функций организма.....</i>	<i>36</i>
ГЛАВА II	44
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	44
<i>2.1. Методики исследования.....</i>	<i>44</i>
<i>2.2. Растворы и реактивы.....</i>	<i>46</i>
<i>2.3. Статистическая обработка</i>	<i>47</i>
ГЛАВА III.....	49
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	49
<i>3.1. Исследование влияния сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы</i>	<i>49</i>
<i>3.1.1. Влияние сероводорода на механическое напряжение сегментов аорты, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса.....</i>	<i>49</i>

3.1.2. Влияние сероводорода на сократительную активность гладких мышц аорты крысы, индуцированную фенилэфрином	50
3.2. <i>Исследование механизмов констрикторного действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы аорты крысы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса</i>	53
3.2.1. Роль кофеин-чувствительного кальциевого депо саркоплазматического ретикулума сосудистых гладкомышечных клеток в механизмах констрикторного действия сероводорода на изолированные сегменты аорты крысы.....	53
3.2.2. Исследование роли Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспорта в реализации констрикторного действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса	55
3.2.3. Исследование влияния сероводорода на активность Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспорта	57
3.3. <i>Исследование роли калиевой проводимости мембраны в механизмах действия сероводорода на сократительную активность сосудистых гладких мышц, индуцированную гиперкалиевым раствором Кребса</i>	59
3.3.1. Влияние тетраэтиламмония на релаксирующее действие гидросульфида натрия при сокращениях сосудистых гладких мышц, вызванных гиперкалиевым раствором Кребса	60
3.3.2. Роль потенциал-зависимых калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии гидросульфида натрия на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса	61
3.3.3. Роль кальций-активируемых калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии гидросульфида натрия на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса	63
3.3.4. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии гидросульфида натрия на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса	63

3.3.5. Определение относительного вклада различных типов калиевых каналов в релаксирующее действие сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса	66
<i>3.4. Исследование роли калиевой проводимости мембраны в механизмах действия сероводорода на сократительную активность сосудистых гладких мышц, индуцированную фенилэфрином.....</i>	<i>67</i>
3.4.1. Влияние тетраэтиламмония на релаксирующее действие гидросульфида натрия при сокращениях сосудистых гладких мышц, вызванных фенилэфрином	68
3.4.2. Роль потенциал-зависимых калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии гидросульфида натрия на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином.....	68
3.4.3. Роль кальций-активируемых калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии гидросульфида натрия на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином.....	71
3.4.4. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии гидросульфида натрия на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином.....	71
3.4.5. Определение относительного вклада различных типов калиевых каналов в релаксирующее действие сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином.....	74
Заключение	76
Список литературы	79

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сероводород (H_2S) наряду с другими газообразными сигнальными молекулами, такими как монооксид азота (NO) и монооксид углерода (CO), относят к группе газотрансмиттеров. В отличие от классических гормонов и нейротрансмиттеров, H_2S , как и другие газовые посредники, свободно проникает через плазматическую мембрану и включает внутриклеточную сигнализацию рецептор-независимым способом. Свое биологическое действие он проявляет путем различных взаимодействий с макромолекулами, такими как нековалентное связывание с регуляторными субъединицами белков, пространственная оккупация ближайшего окружения и пространств внутри структуры белка, что препятствует доступу других газов в функционально критические белковые сайты [190].

Благодаря этим уникальным свойствам H_2S вовлечен в процессы как внутриклеточной, так и межклеточной коммуникации и участвует в регуляции большого числа клеточных функций, включая сосудистый тонус [218], работу центральной нервной системы [44], воспаление [144], пролиферацию, дифференцировку, гибель клеток [214] и др.

В отличие от NO, механизмы действия которого во многом исследованы и определены регуляторные процессы, протекающие с участием этого газа [13, 14, 137], сероводород как сигнальная молекула остается недостаточно изученным. Общеизвестным является сосудорасслабляющее действие сероводорода, однако дискуссионными остаются вопросы о мембранных и молекулярных мишенях, через которые реализуются такие эффекты. В самом деле, в многочисленных исследованиях показано, что донор сероводорода гидросульфид натрия (NaHS) расслабляет кровеносные сосуды различных типов [139, 135].

Гиперполяризацию мембраны сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК) и расслабление при действии сероводорода связывают с активацией АТФ-чувствительных K^+ каналов (K_{ATP}). Расслабление СГМК в этом случае может быть обусловлено уменьшением потенциал-зависимого входа Ca^{2+} вследствие гиперполяризации мембраны [148, 136].

Значительно менее изучено влияние сероводорода на другие системы трансмембранного переноса ионов. Так, по данным W.S. Cheang, в коронарных артериях крысы сероводород обуславливает гиперполяризацию мембраны СГМК и их последующую эндотелий - независимую релаксацию посредством активации калиевых каналов, чувствительных к 4-аминопиридину [65]. Высказываются предположения о действии H_2S на Ca^{2+} - активируемые калиевые каналы малой (SK_{Ca}) и промежуточной проводимости (IK_{Ca}) [201], потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы L- типа [195], Cl^-/HCO_3^- обменник [143]. Спорным остается вопрос о возможности и механизмах констрикторного действия сероводорода. Возбуждающее действие сероводорода на СГМК было описано в работе J.J. Lim, которая объяснила этот феномен снижением внутриклеточного содержания цАМФ вследствие ингибирования сероводородом аденилатциклазы (АЦ) [142].

Подводя итог, можно заключить, что, несмотря на довольно многочисленные исследования действия сероводорода на сократительную активность сосудистых гладких мышц, многие вопросы не нашли удовлетворительного решения. Это касается как самих эффектов, вызываемых H_2S в СГМК, так и мембранных механизмов, вовлекаемых этим газотрансмиттером в реализацию своих эффектов.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

Исследовать влияние и механизмы действия сероводорода на сократительную активность сосудистых гладких мышц.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Исследовать действие донора H_2S гидросульфида натрия на механическое напряжение сосудистых гладких мышц аорты крысы, индуцированное деполяризацией мембраны гиперкалиевым раствором Кребса.

2. Изучить эффекты гидросульфида натрия в сосудистых гладких мышцах аорты крысы, предсокращенных стимуляцией α_1 -адренергических рецепторов.

3. Определить вклад Na^+ , K^+ , 2Cl^- –котранспорта в механизмы действия сероводорода на механическое напряжение гладких мышц аорты крысы.

4. Установить роль изменений калиевой проводимости мембраны в механизмах действия H_2S на сократительную активность сосудистых гладкомышечных клеток.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Действие сероводорода на гладкомышечные клетки аорты крысы разнонаправлено и зависит от концентрации и природы предсокращения сосудистых гладких мышц. При сокращении, индуцированном деполяризацией мембраны в гиперкалиевом растворе Кребса, сероводород в малых (до 100 мкМ) концентрациях увеличивает механическое напряжение изолированных сегментов аорты, а при повышении концентрации - вызывает расслабление последних. В

сосудистых гладких мышцах, предсокращенных фенилэфрином, сероводород во всех использованных концентрациях вызывает дозозависимое расслабление.

2. Одной из ключевых мишеней сероводорода является Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспортер, через активацию которого реализуется констрикторное действие этого газотрансмиттера на гладкие мышцы аорты крысы.

3. В основе релаксирующего действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы лежит увеличение калиевой проводимости мембраны: в СГМК, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, главным образом, за счет кальций-активируемого, а при предсокращении, индуцированном возбуждением α_1 -адренорецепторов, - АТФ-чувствительного ее компонентов.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Установлено разнонаправленное действие сероводорода на механическое напряжение сосудистых гладкомышечных клеток аорты крысы. Впервые идентифицирована новая мишень - Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспортер, который вовлечен в механизмы регуляции сероводородом сократительной активности сосудистых гладких мышц, и продемонстрирована его роль как ключевого эффектора вазоконстрикторного действия сероводорода. Установлено, что открывание кальций-активируемых калиевых каналов малой и промежуточной проводимости мембраны сосудистых гладкомышечных клеток является основным механизмом релаксации гладких мышц аорты крысы, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, а открывание АТФ-чувствительных калиевых каналов – расслабления СГМК, предсокращенных фенилэфрином.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Результаты исследования являются вкладом в развитие фундаментальных знаний о механизмах внутриклеточной коммуникации. Определены механизмы констрикторного и релаксирующего действия газового посредника H_2S . Полученные данные дополняют сведения о механизмах регуляции тонуса кровеносных сосудов газотрансмиттерами. Результаты исследования могут быть использованы при разработке молекулярных технологий управления поведением клеток путем модификации газовой коммуникации в СГМК, местной профилактики спастических состояний и рестеноза сосудистых трансплантатов. Сформулированные в работе положения используются в курсах лекций и практических занятиях, проводимых на кафедрах биофизики и функциональной диагностики, нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета. Полученные данные и методические приемы используются в научных исследованиях, проводимых на кафедрах биофизики и функциональной диагностики, нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета. Области применения полученных данных: физиология, биофизика, фармакология.

СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 102 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав: «Обзор литературы», «Материал и методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», заключения. Библиография включает 222 ссылок, в том числе 43 – работы отечественных авторов и 179 – зарубежных. Работа иллюстрирована 12 рисунками и 3 таблицами.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Полученные результаты обсуждены на всероссийских и международных конференциях и конгрессах: 74-я итоговая студенческая научно – практическая конференция с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения профессора А.М. Дыхно (Красноярск, 2010), Всероссийская 69-я итоговая научная студенческая конференция, посвященная 200-летию со дня рождения Н.И. Пирогова (Томск, 2010), XI конгресс молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2010), V Международная научная конференция «Психофизиологические и висцеральные функции в норме и патологии», посвященная 100 -летию со дня рождения профессора Павла Дмитриевича Харченко и 65-летию НИИ физиологии имени Петра Богача (Киев, 2010), 21st European meeting on hypertension and cardiovascular prevention (Milan, 2011), 22nd European meeting on hypertension and cardiovascular prevention (London, 2012).

Исследования поддержаны грантами федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы: «Разработка технологических основ селективного управления внутриклеточной газовой сигнализацией» (государственный контракт № 02.740.11.5031 от 20.06. 2009 г.), «Селективная модуляция внутриклеточной коммуникации как основа молекулярных технологий управления функциями клеток» (государственный контракт № 14.740.11.0932 от 12.04.2011 г.), «Гипоксия как фактор регуляции транскриптома и сократительных свойств кровеносных сосудов» (соглашение 8487 от 23.10.2012 г.).

ЛИЧНОЕ УЧАСТИЕ АВТОРА

Автор принимал непосредственное участие в разработке идеи и планировании исследования, анализировал литературу. Автором лично выполнена экспериментальная часть работы, проведена статистическая обработка полученных данных, обсуждение результатов, оформление основных публикаций по теме диссертации.

По теме диссертации опубликовано 12 работ, из которых 4 – в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

ГЛАВА I

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структурная организация гладкомышечных клеток

Гладкомышечная клетка (ГМК) является важной структурной и функциональной единицей стенки кровеносных сосудов, обеспечивая поддержание и регуляцию тонуса последних. Размеры ГМК в зависимости от тканевой принадлежности варьируют в широких пределах: от 20 мкм в артериолах до 200 мкм в артериях мышечного типа. Толщина клеток колеблется от 5 до 10 мкм [40]. С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было выделено два типа сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК): клетки веретеновидной и клетки округлой формы, причем последние характерны преимущественно для артериол малого диаметра. Формируя стенку сосуда, клетки располагаются параллельно друг другу, не образуя контактов между терминальными концами двух прилежащих клеток [161]. Саркоплазматическая мембрана гладкомышечных клеток обладает неодинаковой проницаемостью для различных ионов [40]. Ее проницаемость для ионов хлора и калия вдвое превосходит таковую для мембраны скелетных мышечных клеток [9,40].

Сократительный аппарат гладкомышечных клеток не содержит саркомеров, но, как и в поперечно-полосатых мышцах, организован в постоянную структуру, в которой различают продольно взаимодействующие филаменты актина и миозина, а также аналоги Z-дисков - плотные тельца [39]. Характерной особенностью актина является его способность активировать гидролиз АТФ, катализируемый миозином. Выделяют мономерную (G-актин) и фибриллярную (F-актин) форму

актина. Глобула мономерного G-актина связана с молекулой АТФ и имеет молекулярную массу около 45 кД. Взаимодействие мономеров актина (G-актин) друг с другом приводит к образованию фибриллярного актина (F-актина). Две молекулы F-актина скручиваются друг относительно друга, образуя нить диаметром 6-7 нм. Нить F-актина полярна (имеет «+» и «-» концы), поэтому рост ее происходит на «+» конце путем присоединения к нему мономеров, связанных с АТФ. Рост нити актина сопровождается гидролизом АТФ до АДФ, при этом мономеры, связанные с АДФ, теряют прочность, что приводит к началу деполимеризации. Таким образом, обе формы актина находятся в динамическом равновесии друг с другом [10].

Молекула миозина состоит из шести полипептидных цепей, которые включают в себя две тяжелые и четыре легкие цепи миозина (ЛЦМ). Тяжелые цепи миозина имеют молекулярную массу 200–250 кД и сильно асимметричную структуру. В состав тяжелой цепи входит длинный спирализованный хвост и компактная грушевидная головка. Переход грушевидной головки тяжелой цепи миозина в спиральный хвост находится в области шейки. Известно 4 изоформы тяжелых цепей миозина, обозначаемых SMB, SMA, SM1 и SM2 [174]. Отличие этих изоформ состоит в числе аминокислот, образующих головку и хвостовую часть стержня. Различия в строении хвостовых участков стержня миозина гладких мышц обуславливают различия в сборке филаментов. Например, различные функции в ГМК могут выполнять толстые филаменты, содержащие SM1 или SM2 [174, 179].

С каждой головкой тяжелой цепи миозина связаны одна существенная и одна регуляторная легкая цепь миозина [10]. Короткие легкие цепи миозина имеют молекулярную массу 18–28 кД. При фосфорилировании легких цепей миозина массой 20 кД актин-зависимая активация АТФ-азной активности миозина возрастает в 50 раз.

ГМК не содержат тропонин, что отличает их от поперечно-полосатых мышечных волокон. Функцию тропонина в них выполняют два других фибриллярных белка – кальдесмон и кальпонин [19, 187], которые расположены периферически вдоль спирали полимеризованного актина и участвуют в регуляции сокращения.

Кальпонин и кальдесмон представляют собой белки массой 34 кД и 130-140 кД. В структуре этих молекул содержатся сайты связывания актина, тропомиозина, а также комплекса кальций - кальмодулин (Ca-КМ).

Функция этих белков в гладкомышечных клетках долгое время оставалась малоизученной. К настоящему времени имеются данные о том, что экспрессия кальдесмона и кальпонина в ГМК артериол коррелирует с устойчивостью к гипероксии [101]. Также имеются данные, демонстрирующие снижение уровня кальпонина и кальдесмона при спастических состояниях мозговых артерий. При этом наблюдалось увеличение уровня их фосфорилирования [194].

Вероятно, данные наблюдения связаны с тем, что и кальпонин, и кальдесмон ингибируют активируемую актином АТФ-азную активность миозина, что в свою очередь снижает скорость скольжения актиновых филаментов относительно миозина. Кальпонин, по-видимому, может также взаимодействовать с фосфолипидами, участвуя в прикреплении актиновых филаментов к клеточной мембране [19].

Для гладких мышц характерен миозиновый тип регуляции сократительной активности, в основе которого лежит изменение структуры легких цепей миозина. Миозиновые филаменты гладких мышц связаны с киназой легких цепей миозина (КЛЦМ). Этот фермент принадлежит к группе протеинкиназ. Его функция заключается в фосфорилировании оксигрупп остатков серина или треонина. В структуре фермента содержится специальный участок, ингибирующий активность КЛЦМ в состоянии покоя, которое характеризуется низким содержанием Ca^{2+} [10]. Активация КЛЦМ происходит при взаимодействии ее с насыщенными ионами

Ca^+ кальмодулином – цитоплазматическим белком, содержащим в своей структуре четыре Ca^{2+} -связывающих центра [3, 4, 10]. При активации КЛЦМ происходит фосфорилирование регуляторных легких цепей миозина по сериновым остаткам. Данный процесс сопровождается значительными изменениями в структуре как легкой, так и тяжелой цепи миозина в области их контакта друг с другом. Благодаря фосфорилированию легкой цепи, миозин вступает во взаимодействие с актином, что лежит в основе развития мышечного сокращения. При снижении внутриклеточной концентрации кальция происходит диссоциация его ионов из катионсвязывающих центров кальмодулина. В свою очередь кальмодулин диссоциирует от КЛЦМ, вызывая тем самым ее ингибирование. Противоположным по действию КЛЦМ является фосфотаза легких цепей миозина. Функция этого фермента заключается в удалении остатков фосфорной кислоты с регуляторных цепей миозина, тем самым останавливается циклическое движение его головок. Этот механизм лежит в основе расслабления [11].

Важной особенностью СГМК является их высокая энергетическая экономичность, связанная с низким потреблением АТФ: его потребление в фазе поддержания напряжения в СГМ при калиевой контрактуре почти в 1000 раз меньше, чем в скелетных мышцах теплокровных животных [156]. Максимальная скорость изотонического сокращения СГМ наименьшая среди других гладких мышц. Так, скорость гидролиза АТФ актомиозином СГМК примерно в 170 раз ниже, чем в скелетных мышцах. Дополнительный вклад в энергетическую эффективность гладких мышц вносит большая длина миозиновых протофибрилл и увеличенное относительное содержание актина, наличие медленноциклирующих и нециклирующих поперечных мостиков.

При развитии напряжения до 15% всей потребляемой мышцей энергии расходуется на процессы, не связанные с актинактивирующей АТФ-азной активностью. Поэтому замедление скорости потребления АТФ в фазе

поддержания напряжения обусловлено только уменьшением скорости циклирования поперечных мостиков. Однако скорость циклирования мостиков и потребления высокоэнергетических фосфатов в ходе изометрического сокращения ГМ может определяться непосредственно концентрацией Ca^{2+} при остающемся постоянным уровне фосфорилирования [40].

1.2. Организация внутриклеточных сигнальных систем в регуляции сократительной активности гладких мышц сосудов

Впервые концепция внутриклеточных вторичных сигнальных посредников была развита Earl Sutherland и его коллегами в 1972 г., когда была обнаружена молекула циклического аденозин-3':5'-монофосфата (цАМФ). Позднее ими же была описана аденилатциклаза – мембраносвязанный фермент, осуществляющий синтез цАМФ из АТФ, и ферменты, разрушающие цАМФ, – фосфодиэстеразы [97]. Позднее в список вторичных мессенджеров были включены Ca^{2+} , цГМФ, ИТФ и ДАГ. Все эти молекулы присутствуют в ГМК, регулируя их функциональное состояние и сократительную активность [3, 5, 16].

Первым этапом в процессе активации мышечных клеток, согласно современным представлениям о проблеме электромеханического сопряжения, является вход Ca^{2+} в цитоплазму по рецептор-управляемым и/или потенциал-зависимым Ca^{2+} -каналам плазмалеммы и последующее развитие Ca^{2+} сигнала [43]. Блокаторы Ca^{2+} -каналов, а также использование бескальциевой среды [43,130] вызывают значительное снижение амплитуды сокращения.

Концентрация свободного Ca^{2+} в саркоплазме большинства гладких мышц составляет $1\text{--}2 \cdot 10^{-7}$ М [28]. Сократительный ответ развивается при повышении

внутриклеточной концентрации Ca^{2+} до 1 мкМ [29]. Характерной особенностью ГМК является слабое развитие Т-системы, а саркоплазматический ретикулум (СПР) составляет только 8% от объема цитоплазмы [16]. Тем не менее, активация ГМК осуществляется за счет вхождения экзогенного Ca^{2+} в цитоплазму по потенциал-зависимым или рецептор-управляемым Ca^{2+} -каналам [36]. Также в мембране ГМК возможно присутствие особой группы кальциевых каналов, для которых одновременно характерна как хемо-, так и потенциал-зависимость [6].

Рецептор-управляемый вход ионов кальция опосредуется взаимодействием комплекса рецептор-лиганд с ГТФ-связывающими G-белками мембраны [6, 33, 35]. G-белки активируют фосфолипазу C, которая в свою очередь активирует метаболизм мембранных фосфоинозитидов. Следствием этих процессов является появление в цитозоле инозитолтрифосфата (ИТФ) [16, 27, 58]. ИТФ способен перемещаться в цитозоле, высвобождая ионы кальция из немитохондриальных депо во всех типах гладкомышечных клеток [16, 33, 41, 58].

Деполаризацию мембраны сосудистых гладкомышечных клеток и последующую активацию потенциал-зависимых кальциевых каналов индуцирует входящий Ca^{2+} ток, протекающий по хемочувствительным ионным каналам [25, 40, 41]. Пул потенциал-зависимых кальциевых каналов, исходя из кинетики активации и инактивации, неоднороден. Согласно данным М.Ф.Шубы, пул потенциал-зависимых кальциевых каналов подразделяется на быстрые инактивирующиеся и медленные неинактивирующиеся кальциевые каналы. Эти каналы отличаются параметрами активации и инактивации, а также механизмами регуляции [15, 40]. Ионная проницаемость этих каналов в большей степени модулируется метаболическими [32] и/или кальций-зависимыми механизмами [52].

Сокращение ГМК наблюдается при увеличении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} до 1 мкМ и выше [6, 41, 43]. При этом ионы кальция, поступающие во время деполаризации мембраны в ГМК, вероятнее всего, не

принимают непосредственного участия в развитии сокращения, а активируют Ca^{2+} -зависимое высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных кальциевых депо [7, 116].

По данным некоторых исследователей, между входом внеклеточного Ca^{2+} и освобождением его из мест депонирования важную роль могут играть локальные изменения внутриклеточного рН. Такие изменения, вероятно, обусловлены $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ - обменом плазмалеммы. Вход Ca^{2+} в клетку по селективным каналам при возбуждении сопровождается выходом из нее H^+ по градиенту концентрации, а также по селективным K^+ -каналам. Это вызывает кратковременное локальное повышение рН в области каналов, высвобождающих Ca^{2+} из СПР, что способствует их открыванию при депротонировании функционально значимых карбоксильных групп воротного механизма упомянутых структур [36].

С другой стороны, высвобождение ионов Ca^{2+} из СПР может индуцировать входящий ток Ca^{2+} через Ca^{2+} -каналы, опосредованные внутриклеточным депо (SOC). Активация SOC требует целостности взаимодействия плазматической мембраны и СПР и связана с конформационными перестройками рианодиновых рецепторов. Зависимое от Ca^{2+} высвобождение катионов из СПР осуществляется, очевидно, также путем активации рианодинового рецептора СПР низкими (микромольными) концентрациями катионов Ca^{2+} [146]. Рианодиновый рецептор представляет собой одновременно канальную структуру. Его синтетическими агонистами являются рианодин и кофеин, а физиологическими – цАДФ-рибоза (продукт цАДФ-рибозилтрансферазной реакции, которая активируется NO/цГМФ) [29]. SOC – опосредованный ток Ca^{2+} обеспечивает механизмы восполнения запасов внутриклеточного Ca^{2+} и поставляет Ca^{2+} , необходимый для сокращения мышц [146].

Свои внутриклеточные эффекты ионы Ca^{2+} реализуют через активацию Ca^{2+} -кальмодулиновой системы [4, 6, 17, 25, 94]. Характерной особенностью этой системы является ее способность одновременно запускать механизмы как

поступления Ca^{2+} внутрь клетки, так и выведения его во внеклеточную среду, а также механизмы депонирования Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме [6, 25]. На основании этого можно заключить, что кальмодулин (КМ) занимает важное место в процессах сопряжения возбуждения-сокращения в гладкомышечных клетках [5, 6]. Комплекс Ca^{2+} -КМ ингибирует кальций-кальмодулин-зависимые протеинкиназы (Ca^{2+} -КМ-ПК), в частности, КЛЦМ, которая является важным участником сократительного процесса ГМК [6, 17, 25, 72, 94].

При превышении пороговой внутриклеточной концентрации ионов кальция, равной 1 мкМ, происходит изменение конформации молекулы кальмодулина, следствием чего является экспонирование его гидрофобных областей [6, 17, 25]. Через эти участки осуществляется взаимодействие комплекса Ca^{2+} -КМ с эффекторными системами.

Ионы кальция и активируемая ими система Ca^{2+} -КМ-ПК участвуют в регуляции многочисленных внутриклеточных процессов. Так, ионы Ca^{2+} принимают участие в регуляции внутриклеточного метаболизма через взаимодействие системы Ca^{2+} -кальмодулин с другими системами вторичных посредников [6, 8, 25, 140].

Большое внимание уделяется влиянию кальциевых механизмов регуляции на другие внутриклеточные сигнальные системы. К числу таких систем относятся аденилат- и гуанилатциклазные системы; системы, связанные с метаболизмом мембранных фосфолипидов, циклических нуклеотидов и углеводов и др. [6, 16, 34, 35, 140].

Аденилатциклазная система клетки представляет собой каскад ферментов, осуществляющий проведение многих внеклеточных регуляторных сигналов, вызываемых гормонами, медиаторами, простагландинами, лекарственными препаратами, токсинами и т.д. [3]. В гладкомышечных клетках сосудов цАМФ является ключевым звеном, обеспечивающим их релаксацию, в частности, при действии агонистов β -адренорецепторов [129, 147]. Регуляция синтеза цАМФ

осуществляется изменением активности аденилатциклазы (АЦ) при присоединении первичного посредника к мембранным рецепторам и активацией ГТФ-связывающих белков (G-белков), которые взаимодействуют с АЦ. В этом процессе участвуют два типа G-белков: G_s -белки ускоряют синтез цАМФ, в то время как G_i -белки, напротив, ингибируют. В свою очередь цАМФ активирует цАМФ-зависимые протеинкиназы (ПК-А), фосфорилирующие ряд внутриклеточных белков [3].

цАМФ-зависимая сигнальная система реализует свое регуляторное действие в ГМК различными путями. Одним из них является участие цАМФ в активации калиевой проводимости мембраны ГМК [3, 6, 41, 42, 43]. Было показано, что введение в клетку цАМФ, активация форсколином АЦ [3], ингибирование расщепляющих цАМФ ферментов - фосфодиэстераз [102] приводит к снижению мышечного напряжения и развитию гиперполяризации мембраны ГМК. Наиболее вероятный механизм угнетающего влияния на калиевую проводимость мембраны, вероятно, связан с фосфорилированием протеинкиназой А субъединиц калиевого канала или сопряженных с этим каналом регуляторных белков [3, 6, 160, 176, 196]. Аналогичное действие оказывает необратимый активатор G_s -белка аденилатциклазы $GTP\gamma S$, [33, 34, 35, 119].

В то же время существуют данные, согласно которым проводимость потенциал-зависимых калиевых каналов снижалась при действии простагландина E_2 , форсколина и растворимого аналога циклического аденозинмонофосфата - дибутирил-цАМФ [167, 181].

Среди других модулирующих эффектов цАМФ-зависимой сигнальной системы в гладкомышечных клетках является их способность оказывать влияние на механизмы регуляции кальциевого гомеостаза ГМК.

В некоторых работах отмечено угнетающее влияние цАМФ или ПК-А на потенциал-зависимый вход ионов кальция [66, 168]. Так, активация цАМФ-

зависимой протинкиназы (ПК-А) 8-бромо-цАМФ приводила к ингибированию Ca^{2+} -токов через Ca^{2+} -каналы L-типа.

Рассматривается возможность активирующего влияния ПК-А на кальциевые АТФ-азы саркоплазматической мембраны и мембраны саркоплазматического ретикулума ГМК [165]. Существуют указания на ингибирующее влияние цАМФ в отношении $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ - котранспорта, следствием чего является защелачивание цитоплазмы [198]. Повышение рН, в свою очередь, приводит к увеличению концентрации цитозольного Ca^{2+} , вызывая сократительный ответ мышечных клеток [36].

В то же время не исключается возможность прямого влияния цАМФ на белки, участвующие в регуляции сократительного аппарата ГМК. Так, было показано, что цАМФ-зависимое фосфорилирование легких цепей миозина сопровождается снижением их сродства к ионам кальция и кальмодулину, что приводит к снижению сократительной активности гладких мышц [17].

1.3. Ионные механизмы регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток

Непрерывный поток ионов через клеточные мембраны осуществляется ионными каналами и белками-переносчиками ионов. Точно управляемые трансмембранные потоки ионов имеют важное значение для поддержания жизнедеятельности клеток. Например, в клетках ионные потоки опосредуют разнообразные процессы, такие как сигнализация, постоянство рН, регуляцию объема клеток и клеточного цикла, а у высших организмов они лежат в основе иммунного ответа, секреции, сокращения мышц, электрических сигналов в нервах, мышцах, синапсах.

Поток ионов через каналы способствует генерации трансмембранных электрических токов. Токи ионов Na^+ и K^+ вызывают изменение мембранного потенциала и действуют как физические сигналы, тогда как для кальциевого тока ионы Ca^{2+} обычно сами по себе представляют сигнал, в данном случае - химический. Токи ионов хлора, как правило, участвуют в стабилизации мембранных потенциалов, например, в тормозных синапсах и в скелетных мышечных волокнах, а также облегчают трансмембранное движение ионов и воды [85].

Среди ионных переносчиков важное место занимает Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспорт (NKCC), который участвует в поддержании внутриклеточной концентрации Cl^- на уровне выше предсказанного электрохимического потенциала. Есть доказательства того, что работа NKCC компенсирует осмотическое сжатие клеток, обеспечивая приток осмотически активных ионов [180].

NKCC – это негликозилированный белок, имеющий молекулярную массу 120-130 кД. Существуют две изоформы этого белка: NKCC1 и NKCC2. При этом NKCC2 представлен преимущественно в апикальной мембране эпителиальных клеток петли Генле, в то время как NKCC1 обнаруживается практически во всех типах клеток.

Белок – переносчик NKCC состоит из центральной гидрофобной области с молекулярной массой ~ 50 кД, которая окружена амино-(~ 20-30 кД) и карбокси-концевыми (~ 50 кД) участками. Последние два участка более гидрофильны, чем центральные области молекулы. На основе такого анализа, Ху J.C. с соавторами [211] предположил, что существуют 12 α -спиральных трансмембранных регионов, которые высоко консервативны. Так, изоформы белка NKCC1 и NKCC2 на 75-90 % идентичны между собой [210].

Существуют две изоформы NKCC. Изоформа NKCC1 (также известная как SLC12A2) первоначально была выявлена на базолатеральной мембране

ректальных желез акулы. Эта изоформа также была обнаружена Delpire с соавт. в почке мыши [74], но названа BSC2. Другая изоформа называется NKCC2 (или BSC1, также известный как SLC12A1). Изоформа NKCC1 является наибольшей из двух изоформ, она содержит около 1200 аминокислотных остатков и транскрипт размером примерно 7.4 Кб. Он на 58 % идентичен с NKCC2 по аминокислотному составу. Изоформа NKCC2 несколько меньше, чем NKCC1, и содержит около 1100 аминокислотных остатков и транскрипт размером ~ 5 Кб. Разница в размере молекул почти полностью приходится на дополнительные 80 аминокислот на амино-конце NKCC1. В противоположность этому, карбокси-конец молекулы относительно хорошо сохраняется [180]. Однако эти изоформы являются продуктами двух различных генов. На мышах было показано, что ген NKCC1 локализуется на хромосоме 18, тогда как ген NKCC2 локализуется на хромосоме 2. Ген NKCC1 человека локализован на хромосоме 5 [74].

Для NKCC характерны три уникальные свойства: 1) нормальное оперирование котранспортера осуществляется только в присутствии всех трех ионов (Na^+ , K^+ и Cl^-) с одной стороны мембраны; 2) буметанид и его аналоги (петлевые диуретики – производные 5-сульфанил бензойной кислоты) связываются с белком-котранспортером и ингибируют перенос всех трех ионов; 3) транспорт всех трех ионов является электрически нейтральным процессом; стехиометрия переноса ионов в большинстве клеток составляет: $1\text{Na}^+ : 1\text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$; реже: $2\text{Na}^+ : 1\text{K}^+ : 3\text{Cl}^-$ [180].

При ингибировании NKCC буметанидом наблюдалось снижение амплитуды сокращений ГМК аорты крысы и мочеточника морской свинки, вызванных фенилэфрином, деполяризующим гиперкалиевым раствором и электростимуляцией [46, 127]. При этом ингибирующее влияние буметанида на сокращение, вызванное деполяризацией клеточных мембран гиперкалиевым раствором, а также высокими (свыше 0.1 мкМ) концентрациями фенилэфрина,

обнаружено не было. В то же время при концентрации фенилэфрина 0.01 мкМ буметанид практически полностью блокировал сокращение [46].

Впервые возможность вклада НКСС в поддержание сосудистого тонуса посредством регулирования трансмембранного градиента Cl^- предложил Brown с соавторами [63]. Действительно, как показывают многочисленные эксперименты, ингибитор НКСС буметанид уменьшает внутриклеточную концентрацию Cl^- [71, 50], гиперполяризует мембрану СГМК и уменьшает число открытых потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа [50]. Эти данные объясняют механизмы, лежащие в основе угнетающего действия ингибиторов НКСС на базальный тонус [111, 169], на сокращения ГМ, вызванные деполяризацией мембраны гиперкалиевым раствором, электрическими стимулами и физиологически активными веществами [170, 125, 124, 155], а также констрикторных эффектов активации этого котранспорта.

Расслабление гладкомышечных клеток во многом опосредуется открыванием калиевых каналов мембраны, увеличением выходящего калиевого тока с последующей гиперполяризацией мембраны.

Селективная проводимость мембраны возбудимых клеток для ионов калия была впервые постулирована в 1902 году Julius Bernstein, что послужило основой к дальнейшему открытию калиевых каналов [97].

Современная классификация K^+ -каналов основывается на данных молекулярной биологии и гомологии генов. В настоящее время установлен целый ряд генов, кодирующих различные типы K^+ -каналов [12].

В принятой в настоящее время классификации K^+ -каналов выделяют потенциал-зависимые K^+ -каналы (K^+_v); Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы ($K^+_{Ca^{2+}}$); 3) inward rectifier K^+ -channels – K^+ -каналы аномального выпрямления с током входящего направления (K_{ir}), к числу которых относятся АТФ-чувствительные калиевые каналы.

Потенциал-управляемые K^+ -каналы. До настоящего времени в человеческом геноме описаны 38 генов, кодирующих членов суперсемейства K^+_v – каналов. Эти каналы попадают в одну из двух классических категорий: delayed rectifier K^+ -channels – каналы задержанного выпрямления и fast transient K^+ -channels – быстрые транзиторные K^+ -каналы выходящего тока (fast transient K^+ -current или transient outward current) [12, 62].

Delayed rectifier K^+ -channels впервые были обнаружены в мембране гигантского аксона кальмара. Термин «delayed» («задержанный») был использован для описания процессов медленной активации, близких к таковым для Na^+ -каналов. Свойства этих каналов (outward rectification) обусловлены: 1) зависимостью воротных механизмов каналов от времени и потенциала, 2) трансмембранным градиентом ионов, 3) асимметричным транспортом ионов через открытые каналы [62].

Быстрые транзиторные K^+ -каналы выходящего тока представляют собой каналы, активируемые низким потенциалом (low voltage – activated). Их активация, так же как и активация delayed rectifier K^+ -channels, зависит от времени и уровня деполяризации [62]. Это быстро инактивирующиеся транзиторные каналы. Они обычно образованы из членов $K_{v1} - K_{v4}$ – подсемейств, а также вспомогательной β – субъединицы, часто необходимой для феномена быстрой инактивации [12].

Как известно, ионы K^+ неодинаково распределены между внеклеточной средой и цитоплазмой, что создает движущую силу для выхода ионов K^+ в больших физиологических пределах мембранного потенциала. K_v -каналы открываются при деполяризации мембраны, что способствует выходу ионов K^+ . Одна из хорошо охарактеризованных ролей K_v - каналов заключается в завершении быстрой деполяризации, вызванной активацией потенциал-зависимого входа катионов [12].

Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы. Выделяют K⁺-каналы большой проводимости (BK_{Ca}), промежуточной (IK_{Ca} или K_{Ca3.1}) и малой (SK_{Ca} или K_{Ca2.3}) проводимости. Эти каналы не являются потенциал – управляемыми и активируются низкими концентрациями внутриклеточного Ca²⁺ (менее 1.0 мкМ/л) [12]. Все три типа каналов представлены в сосудистой стенке, но имеют определенную клеточную и субклеточную организацию. Так, BK_{Ca} в СГМК часто расположены группами по 20-100 единиц, активируемых увеличением внутриклеточной концентрации Ca²⁺. Часто они сопряжены в определенных областях ГМК с эндоплазматическим ретикуломом, образуя сигнальные комплексы с катионными каналами TRPC1 (transient receptor potential canonical channel 1), или не напрямую - с TRPV4 (transient receptor potential vanilloid channel 4). Ca²⁺, входящий через TRPV4, стимулирует рианодиновые рецепторы СПР и увеличивает частоту Ca²⁺-вспышек [83].

Группа SK_{Ca} – каналов включает в себя три канала: K_{Ca2.1}, K_{Ca2.2}, K_{Ca2.3}, чувствительные к блокирующему действию апамина (от 100 пМ/л до 10 нМ/л), что, в свою очередь, отличает их от всех других K⁺Ca²⁺-каналов [12]. SK_{Ca} диффузно распределены в плазматической мембране, преимущественно в области щелевых контактов с эндотелиоцитами и в сайтах, богатых кавеолином и связанных с различными коннексинами. В то же время нет достаточно доказательств функционального значения SK_{Ca} в СГМК, хотя в некоторых артериях отмечалась недифференцированная K⁺-проводимость, чувствительная к апамину. Активация SK_{Ca} ведет к гиперполяризации СГМК посредством электрического сопряжения мембран эндотелиоцитов и СГМК [83].

IK_{Ca} (K_{Ca3.1}) расположены преимущественно на обращенной в сторону СГМК поверхности мембраны эндотелиоцитов. Экспрессия IK_{Ca} в СГМК выражена слабо, хотя их количество резко возрастает при пролиферации клеток. При активации IK_{Ca} выход K⁺ активирует Kir2.1 и/или Na⁺/K⁺ –АТФазы [83].

И $K^+_{Ca^{2+}}$ -каналы с низкой проводимостью, и $K^+_{Ca^{2+}}$ -каналы с промежуточной проводимостью играют важную роль во многих процессах, включающих Ca^{2+} -зависимые процессы в электровозбудимых и электронеовозбудимых клетках. Они обнаруживают свободные ионы через кальмодулин, постоянно связанный с С-терминальным регионом. Связывание Ca^{2+} с кальмодулином приводит к конформационным изменениям, которые являются ответственными за воротный механизм канала [12].

K^+ -каналы аномального выпрямления с током входящего направления. Inward rectifier K^+ channels были открыты в 1949 г. Катцом при деполяризации мышц ионами K^+ . Чтобы отделить свойства этих каналов от «нормальных» K^+ -каналов задержанного выпрямления, он использовал термин «аномальное выпрямление». Аномалия этих каналов заключалась в увеличении их проводимости при гиперполяризации и уменьшении - при деполяризации мембраны [62, 97]. Термин «inward rectifier» означает, что эти каналы работают как клапаны или диоды, преимущественно обеспечивая входящие K^+ -токи при гиперполяризации, но не выходящие – при деполяризации. Inward rectifiers K^+ -channels могут обеспечивать выходящие токи небольшой величины при потенциале, превышающем потенциал покоя на 30 мВ. Когда величина мембранного потенциала ниже потенциала покоя (-60 мВ), наблюдается входящий ток ионов K^+ [97]. Наблюдаемая при потенциале покоя инактивация inward rectifier K^+ channels устраняется гиперполяризацией мембраны. Еще одно интересное свойство данной группы каналов заключается в их регуляции внеклеточной концентрацией ионов K^+ : увеличение внеклеточной концентрации K^+ и, соответственно, деполяризующего потенциала, также устраняет инактивацию этих каналов [62].

Клонирование первых inward rectifiers K^+ -channels – Kir1.1 (ROMK1) и Kir2.1 (IRK1) было осуществлено еще в 1993 г. Позднее была идентифицирована последовательность новых членов этого семейства, включая K^+ -канал, связанный

с G-белком – Kir3, и АТФ-чувствительный K^+ -канал Kir6 [12]. Всего было обнаружено, по крайней мере, семь подсемейств K-каналов данного типа, обозначенных Kir1.0 - Kir7.0 [45]. В настоящее время новые члены этого семейства выявлены не были. Эти каналы имеют более простую структуру по сравнению с другими типами калиевых каналов. По данным рентгеноструктурного анализа они имеют длинную пору, уходящую в цитоплазму. Также подчеркивается важность отрицательных зарядов аминокислотных остатков на стенке цитоплазматической части поры, которая принимает участие в аномальном выпрямлении. Эти исследования обеспечили понимание механизмов регулирования ворот канала посредством лигандов через G-белки и фосфотидилинозитол -4,5 – бифосфат [12].

Kir - каналы обеспечивают контроль потенциала покоя мембраны, связывая метаболизм клетки с возбудимостью клеточной мембраны и поддерживая гомеостаз K^+ . Kir 6.1 и 6.2 находятся в комплексе со структурно несвязанным АТФ-связывающим белком, известным как рецептор сульфонилмочевины SUR. Предполагается, что SUR2B связан с Kir 6.2 или Kir 6.1 и формирует тип $K_{\text{АТФ}}$ -каналов, характерный для сосудов [106, 212]. Через АТФ/АДФ-зависимые механизмы K^+ АТФ-каналы «чувствуют» метаболическое состояние клетки и в соответствии с ним регулируют возбудимость мембраны [45, 48, 80].

Калиевые каналы играют важную роль в мгновенной и пролонгированной регуляции функции гладких мышц сосудов. Активность этих ионных каналов определяет и регулирует мембранный потенциал клетки, который, в свою очередь, регулирует вероятность открытого состояния потенциал – зависимых Ca^{2+} - каналов, вход Ca^{2+} и его внутриклеточную концентрацию. Через свое воздействие на потенциал мембраны K^+ -каналы также устанавливают электрохимический градиент, определяющий движение других ионов через плазматическую мембрану [208].

1.4. Физико-химические свойства сероводорода

Сероводород - или сульфид водорода (H_2S) – бесцветный газ с сильным запахом тухлых яиц. Является слабой двухосновной кислотой. В воде и в плазме крови при температуре t равной $37^\circ C$ H_2S диссоциирует на ион водорода (H^+) и гидросульфид анион (HS^-) с константой диссоциации pK_a равной 6.76. HS^- , в свою очередь, диссоциирует до S^{2-} с pK_a 11.96. В растворе Кребса при t , равной $37^\circ C$, и pH 7.4 образуются 18.5 % H_2S , 81.5 % HS^- и следовые количества S^{2-} [202], а при pH -7.4 и температуре 20^0 раствор сероводорода содержит около 30-33 % непосредственно H_2S и 67-70 % HS^- [44,78].

H_2S растворим в липофильных веществах. Его растворимость в липидах в 5 раз превосходит растворимость в воде, что обуславливает хорошую проникающую способность H_2S через мембранные структуры клетки и не требует специальных каналов [150, 202]. Расчет константы проницаемости (P_M) через бислоиные липидные мембраны для молекулы сероводорода показал, что она составляет 0.5 ± 0.4 см/с [150].

В экспериментальной практике для получения раствора сероводорода рабочий раствор насыщают газообразным H_2S , либо используют доноры сероводорода: гидросульфид натрия ($NaHS$) и сульфид натрия (Na_2S) [140, 218]. В водном растворе $NaHS$ диссоциирует до ионов Na^+ и HS^- . Последний, в свою очередь, взаимодействует с H^+ с формированием H_2S [218]. Na_2S , по данным методов газовой хроматографии/масс-спектрометрии, при помещении в раствор быстро – в течение 1 минуты - превращается в сероводород [140]. Показано, что использование обоих методов дает схожие результаты [218].

1.5. Токсические свойства сероводорода

Более широко известно токсическое действие H_2S на клетку и организм в целом, заключающееся в разобщении процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях вследствие блокирования сульфидом водорода цитохром *c* оксидазы электрон – транспортной цепи [175, 193, 175]. При этом *in vitro* H_2S оказывает негативное влияние на цитохром *c* оксидазу и угнетает процессы аэробного метаболизма уже при концентрациях, релевантных физиологическим [90]. Клинические проявления отравления сероводородом хорошо изучены. Так, длительное экспонирование H_2S в концентрациях больше 500 ppm вызывает дыхательный паралич и смерть в течение нескольких минут [54, 178]. Вообще, обонятельные рецепторы воспринимают H_2S в концентрациях, превышающих 150 ppm, тогда как уже менее 50 ppm H_2S приводит к раздражению слизистых дыхательных путей и глаз, отекам носовой полости и легких [175]. При действии 80 ppm H_2S наблюдается некроз слизистой оболочки носа и обонятельного эпителия [60]. При хронической экспозиции H_2S накапливается в тканях организма и нарушает процессы окислительного фосфорилирования. Однако в концентрациях H_2S менее 30 ppm (~800 мкМ) подобных изменений со стороны органов и тканей не наблюдается. Это, вероятно, связано с быстрым окислением газа в митохондриях [79, 120].

Было показано, что хроническая интоксикация H_2S или сульфидными солями изменяет секрецию нейромедиаторов и их содержание в различных областях мозга. Так, внутрибрюшинное введение $NaHS$ (2*15 мг/кг) приводило к увеличению содержания в стволе мозга аспартата, аланина, глицина, ГАМК, глутамата, таурина, серотонина и ряда других медиаторов. В других отделах мозга такие изменения были выражены в меньшей степени. Возможными причинами этого может быть ингибирование моноаминоксидаз, ацетилхолинэстераз и Na^+ , K^+ -АТФ-азы [204].

В то же время гладкомышечные клетки способны поддерживать свою сократительную функцию за счет энергии, которая образуется в ходе только

гликолиза [68, 172]. Также в гладких мышцах не обнаружено корреляции между потреблением кислорода, который используется в механизмах окислительного фосфорилирования, и развитием сокращения с последующим поддержанием его силы [104]. Эта особенность объясняется высокой энергетической экономичностью СГМ [40] и может обуславливать их устойчивость к ингибирующему действию сероводорода на цитохром *c* оксидазу.

Однако в последнее время все большее внимание обращено к H₂S как к физиологическому регуляторному агенту.

1.6. Пути метаболизма сероводорода в организме

Эндогенный синтез H₂S осуществляется ферментативными системами клеток различных тканей организма. Ферменты, синтезирующие H₂S, были обнаружены в клетках различных органов, к числу которых относятся клетки печени, почек [219], поджелудочной железы [114, 216], а также клетки нервной [44] и сердечно - сосудистой систем [205, 218, 220]. Также в синтезе сероводорода принимает участие микрофлора кишечника [199]. Концентрации H₂S в различных тканях варьируют. В головном мозге крыс в зависимости от отдела она составляет 50–160 мкМ, а в плазме крови крыс примерно 45 мкМ [44]. В плазме крови человека концентрация H₂S составляет около 34 мкМ [213]. H₂S имеет короткий период жизни, т.к. быстро реагирует с гемовыми группами и дисульфидными группами липидов, а также окисляется до сульфата и тиосульфата [113, 202].

Различают ферментативный и неферментативный пути синтеза H₂S. Ферментативный синтез сероводорода в клетках возможен благодаря работе специальных ферментов. К их числу относят два цитозольных пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых фермента: цистотионин-β-синтазу (CBS) и цистотионин-γ-лиазу (CSE), а также 3-меркаптопируват-сульфуртрансферазу (3MST) – зависимый от Zn²⁺ фермент, локализованный как в цитоплазме, так и в

митохондриях [113, 189]. Все три фермента обнаружены в клетках таких органов, как печень и почки [219], поджелудочная железа [114]. В тоже время в нервной системе был обнаружен только CBS [44]. В ГМК, и в частности, в ГМК кровеносных сосудов, синтез H_2S осуществляет фермент CSE. Экспрессия этого фермента была обнаружена в аорте, в мезентериальной, хвостовой и легочной артериях крыс [220], во внутренней грудной артерии человека [205]. Если рассматривать сосудистое русло, то CSE обнаруживается исключительно в СГМК. Для эндотелиальных клеток его экспрессия показана не была [99]. Однако в эндотелиоцитах грудного отдела аорты крыс был обнаружен фермент 3MST, который функционирует в комплексе с CAT – цистеин-аминотрансферазой. Выделяют митохондриальную и цитозольную формы CAT. Используя в качестве субстрата серосодержащую аминокислоту L-цистеин и α -кетоглутарат, CAT продуцирует 3-меркаптопируват (3MP), из которого при участии фермента 3MST синтезируется непосредственно H_2S . В отсутствии α -кетоглутарата синтез H_2S прекращается. Особенностью 3MST является тот факт, что в ГМК кровеносных сосудов он локализован совместно с гладкомышечной α -изоформой актина ASM-1, которая является маркером СГМК. В то же время экспрессия CAT показана только для эндотелиальных клеток [184].

CSE и CBS также используют в качестве субстрата L-цистеин, катализируя реакцию его десульфгидратации: происходит отщепление от цистеина атома серы без последующего его окисления, что ведет к образованию H_2S . Под действием CSE происходит преобразование цистина (дисульфид цистеин) до тиоцистеина, пирувата и аммиака, с последующим неферментативным преобразованием тиоцистеина до цистеина и H_2S . В то же время CBS использует несколько другой путь синтеза H_2S , который заключается в конденсации гомоцистеина с цистеином, и последующим образованием цистатионина [144]. Также в качестве субстратов могут использоваться и другие серосодержащие аминокислоты, такие как метионин и цистин [199].

Неферментативный путь образования H_2S заключается в восстановлении серы до H_2S при окислении глюкозы. Показано, что эритроциты, используя эквиваленты, полученные при окислении глюкозы, восстанавливают S^0 до HS^- [62]. В то же время, если реакция идет по фосфоглюконатному пути, синтез H_2S может не зависеть от уровня серы. Так, в состоянии окислительного стресса наблюдается активация фосфоглюконатного пути, в результате чего происходит усиление синтеза НАДФ, используемого в различных антиоксидантных реакциях, результатом которых является образование H_2S . Однако H_2S может образовываться в результате непосредственного взаимодействия НАДФ с элементарной серой [182].

Еще одной возможностью неферментативного синтеза H_2S является его получение из глутатиона [202].

Катаболизм H_2S менее изучен. Известно, что H_2S быстро окисляется, главным образом в митохондриях, до тиосульфата, который далее преобразуется в сульфит и сульфат.

Окисление H_2S до тиосульфата происходит неферментативно и связано с электрон-транспортной цепью в митохондриях [182]. Фермент тиосульфатцианид-сульфур-трансфераза (TST) переносит серу от тиосульфата к различным акцепторам (например, цианидам), осуществляя тем самым превращение тиосульфата в сульфит [173]. Образованный сульфит далее окисляется до сульфата сульфитоксидазой. Таким образом, конечным продуктом метаболизма H_2S в физиологических условиях является сульфат, который считается специфическим маркером продукции H_2S в организме [55]. Еще один путь метаболизма H_2S заключается в его метилировании тиол-S-метилтрансферазой (TSMТ) до метантиола и диметилсульфида [173]. Данные реакции протекают в цитозоле.

Кроме того, H_2S может присоединяться к метгемоглобину, формируя сульфгемоглобин [202].

1.7. Роль сероводорода в регуляции физиологических функций организма

Существует большое количество литературных данных, указывающих на участие H_2S в регуляции функционирования различных органов и систем организма. В физиологических концентрациях H_2S усиливает выработку провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β и IL-6, активируя моноциты через стимуляцию ERK1/2 / NF- κ B, но не p38 MAPK и JNK [221], и тем самым выступает в роли провоспалительного агента. Усиление под действием H_2S долговременной постсинаптической потенциации в нейронах гиппокампа лежит в основе механизмов памяти [44]. По некоторым данным, H_2S ингибировал индуцированное глюкозой и Ca^{2+} высвобождение инсулина из β -клеток поджелудочной железы крыс [114].

В то же время большое внимание уделяется регуляции сероводородом тонуса кровеносных сосудов [57, 76, 99, 142, 186, 199, 205, 220]. По многочисленным данным, H_2S вызывает расслабление сосудистых ГМК, причем степень H_2S -индуцированного расслабления превосходит таковую при действии NO [99, 108, 205, 218, 220]. В то же время другие тиол-содержащие соединения, такие как цистеин и глутатион, подобного влияния не оказывают [218]. Экспериментальные данные, характеризующие сосудорасслабляющее действие сероводорода, коррелируют с данными клинических исследований. Так, если в группе обследуемых с нормальными показателями артериального давления уровень H_2S в плазме крови составлял 34 мкМ, то у больных артериальной гипертензией уровень H_2S в плазме крови снижался до 20 мкМ по сравнению с контрольной группой. При назначении H_2S больным артериальной гипертензией артериальное давление снижалось [213, 220].

Было показано, что удаление эндотелия, либо блокирование растворимой фракции гуанилатциклазы L-NAME в препаратах с интактным эндотелием не оказывало влияния на максимальную величину релаксации гладкомышечного препарата аорты крысы в ответ на действие H_2S , но значительно смещало кривую зависимости доза-эффект вправо, что свидетельствует о частичной зависимости релаксирующего эффекта H_2S от эндотелия. Возможно, H_2S облегчает освобождение из эндотелия NO и эндотелиального гиперполяризующего фактора EDHF [218]. Однако по данным некоторых исследований зависимость релаксирующего действия H_2S от эндотелия и EDHF отсутствует [65].

Наиболее вероятной мишенью H_2S в клетке считают K^+ _{АТФ}-каналы [108, 211, 216, 218, 220]. Расслабление ГМК стенки сосудов при этом обусловлено гиперполяризацией клеточной мембраны вследствие активации K^+ _{АТФ}-каналов и последующей инактивацией потенциал - зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа, что сопровождается снижением концентрации свободного внутриклеточного Ca^{2+} [220].

В то же время, исходя из способности блокатора АТФ-чувствительных K^+ -каналов глибенкламида дополнительно активировать Cl^- - каналы, в частности Ca^{2+} -чувствительные Cl^- - каналы и Cl^- - каналы, чувствительные к изменению объема, R.A.Dombkowski предложил активацию Cl^- -токов в качестве механизма расслабления гладкомышечных клеток, вызванного действием H_2S [78]. Но, несмотря на это, наиболее популярной остается гипотеза об индуцированной сероводородом активации K^+ _{АТФ}-каналов.

С помощью методов patch-clamp на изолированных СГМК артериол головного мозга было показано, что активатор K^+ _{АТР}-каналов пинацидил, Na_2S и $NaHS$ активируют K^+ -токи при мембранном потенциале, поддерживаемом в соответствующем физиологическом диапазоне (-50мВ) [140].

Согласно некоторым данным, сероводород активировал K^+ _{АТФ} – каналы, содержащие рецепторные субъединицы SUR2B, специфичные к

сульфонилмочевине. В частности, у мышей, нокаутированных по гену SUR2, релаксация мозговых артериол при действии сероводорода, а также активатора K^+ _{АТФ}-каналов пинацидила была значительно менее выражена по сравнению с диким типом [140].

Учитывая, что K^+ _{АТФ}-каналы активируются при снижении внутриклеточной концентрации АТФ, а также принимая во внимание ингибирующее действие H₂S на цитохром *c* оксидазу дыхательной цепи митохондрий, приводящее к снижению продукции АТФ в клетке, можно было бы предположить, что активация K^+ _{АТФ}-каналов является следствием угнетения процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях. Однако работы по измерению АТФ-чувствительных K^+ -токов при действии H₂S, проводившиеся в условиях фиксации внутриклеточной концентрации АТФ, опровергают данное предположение в пользу гипотезы прямой активации K^+ _{АТФ}-каналов [201]. Кроме того, варьирование внутриклеточной концентрации АТФ не влияло на величину H₂S-индуцированной активации этих каналов, что также подтверждает гипотезу прямой активации K^+ _{АТФ}-каналов [108, 205, 220]. С другой стороны, по данным некоторых авторов, ингибирование цитохрома P₄₅₀ значительно снижало величину расслабления, индуцированного H₂S [76].

Следует также принимать во внимание и тот факт, что снижение внутриклеточной концентрации АТФ вследствие ингибирования цитохром *c* оксидазы сульфидом серы может снижать вероятность циклизации актин-миозиновых мостиков [205].

Механизм активации K^+ _{АТФ}-каналов, вероятно, связан с разрушением дисульфидных связей в структуре белков этих каналов [204]. При этом наблюдается переход связи «-S-H» в связь «-S-S-H». В ходе этого процесса такие аминокислоты, как цистеин, присоединяют дополнительный атом серы. Результатом является изменение пространственной конфигурации молекулы

белка, что делает ее более доступной для других химических реакций. За время одной такой реакции модифицируются 10-20 аминокислот из каждой сотни [28].

Одним из эффектов H_2S является угнетение им активности NOX (NADPH оксидазы) и образование O^{2-} , ингибирующего активность K^+ _{АТФ}-каналов [158]. Известно, что активность NOX угнетается NO и PGI₂ через активацию ПК-А и ПК-Г, что в свою очередь ингибирует активацию и транслокацию Rac-1 и gp47phox - ключевые процессы в активации NOX [159]. H_2S ингибирует образование активных форм кислорода (АФК), активируя ПК-А, но не ПК-Г. Таким образом, он оказывает вазопротекторное действие и препятствует развитию внутрисосудистого окислительного стресса, обусловленного активностью NOX [158, 159].

Было показано, что в ГМК кровеносных сосудов метаболизм клетки, связанный с поступлением кислорода и процессами окислительного фосфорилирования, зависит от функции CSE и синтеза сероводорода. В состоянии покоя фермент CSE локализуется только в цитозоле, но не в митохондриях ГМК. Уровень цистеина в митохондриях в три раза выше, чем в цитозоле. Тем не менее установлено, что CSE в условиях гипоксии может перемещаться из цитозоля к митохондриям, что способствует усилению синтеза H_2S из цистеина. Такое перемещение CSE запускалось увеличением внутриклеточной концентрации кальция посредством кальциевых ионофоров. Митохондрии являются основным источником активных форм кислорода, которые образуются на электрон-транспортных цепях и приводят к повреждению тканей. Метаболическая роль сероводорода здесь может осуществляться тремя путями: окисление, метилирование и взаимодействие с цитохром *c* оксидазой, а также другими металлопротеинами и белками, содержащими дисульфидные группы [91].

В экспериментах с ишемией/реперфузией было показано, что, взаимодействуя с цитохром *c* оксидазой, сероводород ингибирует клеточное

дыхание и, следовательно, снижает концентрацию активных форм кислорода. По другим данным, сероводород также способствовал увеличению активности супероксиддисмутазы [191, 163]. Таким образом, в низких концентрациях сероводород способен оказывать цитопротекторное действие, ингибируя процессы окислительного стресса [131, 109].

Вовлечение $K^+_{Ca^{2+}}$ -каналов и K^+_v -каналов в релаксирующее действие H_2S до сих пор отрицалось [218, 220]. Однако сейчас все чаще встречаются сведения об участии как K^+_v -каналов [65], так и $K^+_{Ca^{2+}}$ -каналов большой [222], либо промежуточной проводимости [76]. В коронарных артериях крысы релаксация, индуцированная сероводородом, ослаблялась блокатором K^+_v -каналов 4-аминопиридином, но не глибенкламидом – блокатором K^+_{ATP} – каналов [65]. С использованием patch-clamp было обнаружено, что в эндотелиальных клетках экспозиция NaHS активировала IK_{Ca} каналы. В некоторых концентрациях NaHS вызывал быстрое увеличение K^+ -токов в режиме whole-cell, в частности, компонента K^+ -токов, блокируемого селективным антагонистом IK_{Ca} -каналов ибериотоксином. Активация гидросульфидом натрия токов через IK_{Ca} может быть также продемонстрирована при записи единичных токов, которые не зависят от изменений внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [222].

С другой стороны, активация SK_{Ca} и IK_{Ca} сероводородом может быть опосредована усилением образования эндотелиального гиперполяризующего фактора (EDHF) эндотелиальными клетками. Активация SK_{Ca} мембран эндотелиальных клеток ведет к гиперполяризации СГМК посредством миоэндотелиальных щелевых контактов, тогда как следующий за активацией IK_{Ca} выход ионов K^+ активирует Kir2.1 и/или Na^+/K^+ -АТФ-азы в СГМК [83].

Анализ литературных данных показал, что до сих пор отсутствует однозначное мнение о роли внутриклеточных сигнальных каскадов в механизмах действия H_2S . Одни источники отрицают участие таких молекул, как липоксигеназы, циклоксигеназы, простагландины, цАМФ или цГМФ в

расслаблении сосудов при действии H_2S [76, 123, 220]. Однако согласно другим данным, донор NO нитропруссид Na^+ увеличивал активность фермента CSE [203]. Такое взаимодействие NO - и H_2S –опосредованных сигнальных систем может происходить через нитрозилирование свободных SH-групп в составе CSE, а также через активацию ПК-G [61, 188]. Ингибиторы цистотионин- γ -лиазы DL-propargylglycine и β -cyano-L-alanine снижали внутриклеточную продукцию цГМФ в ГМК аорты крысы, тогда как H_2S вызывал ее увеличение. В присутствии ингибиторов фосфодиэстераз усиление синтеза цГМФ при действии сероводорода прекращалось [64]. Добавление всего 30 мкМ NaHS снижало релаксирующее действие нитропруссид Na^+ на гладкомышечные клетки сосудов [99], а предобработка кольцевых сегментов аорты крысы раствором, содержащим 60 мкМ H_2S , полностью устраняла расслабление, вызванное нитропруссидом Na^+ [218].

Релаксирующее действие ацетилхолина (АЦХ) на сосудистые сегменты в присутствии сероводорода также отсутствовало. Известно, что АЦХ стимулирует высвобождение эндотелиального NO . Поэтому отсутствие релаксации при действии АЦХ может быть обусловлено ингибированием eNOS сероводородом, либо взаимодействием H_2S и NO с образованием неактивного нитрозотиола [186, 205].

Обнаружена зависимость величины H_2S -индуцированной релаксации от поступления в клетку ионов Ca^{2+} : релаксирующее действие H_2S снижается на фоне блокатора потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов нифедипина, либо при удалении Ca^{2+} из омывающего раствора [200, 218]. На культуральных клетках микроглии была показана способность H_2S увеличивать внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} как за счет входящего тока Ca^{2+} через плазматическую мембрану, так и за счет высвобождения его из депо СПР посредством активации системы цАМФ/ПК-A, но не ФЛ-С/ПК-С/ИТФ [133]. По некоторым данным активация сероводородом системы АЦ/цАМФ/ПК-G ведет к последующей

активации Rac-1 и NOX-1, что снижает степень NOX – опосредованного внутрисосудистого окислительного стресса [158]. В то же время было показано, что ингибиторы цАМФ-зависимой сигнальной системы, ПК-С и циклоксигеназы не оказывали влияния на расслабление сосудов, индуцированное H₂S [200].

H₂S-индуцированная релаксация СГМК находит свое объяснение и в допущении, что H₂S изменяет значения внутриклеточного pH: NaHS в концентрации 10-1000 мкМ приводил к дозозависимому снижению pH, обусловленному активацией Cl⁻ / HCO₃⁻ - обменника [134].

Еще один эффект сероводорода на гладкомышечные клетки, отмечаемый лишь некоторыми авторами, наблюдается при действии на клетку его низких концентраций в диапазоне 10 – 100 мкМ и заключается в дополнительном увеличении величин сократительных ответов [76, 123, 142, 205]. Предполагается, что констрикторное действие сероводорода вовлекает цАМФ - зависимую сигнальную систему. Во всяком случае, показано, что H₂S ослаблял и даже обращал релаксирующее действие активатора АЦ форсколина [142]. В то же время предобработка гладкомышечных сегментов мезентериальной артерии крысы ингибиторами протеинкиназы А устраняла как сократительный, так и релаксирующий эффекты сероводорода. Методами иммунофлуоресцентного анализа было подтверждено, что H₂S вызывает миграцию ПК-А к ядру, что может способствовать ее активации [76].

Исходя из способности H₂S вступать в реакцию с молекулярным кислородом с образованием окисленных продуктов (неорганическая сера S⁰ при неполном окислении и оксиды серы SO₂ и SO₃ – при полном), Koenitzer J.R. с соавторами исследовали зависимость сосудистых эффектов H₂S от степени оксигенации раствора, омывающего сосудистые гладкомышечные сегменты. Оказалось, что низкие концентрации H₂S (5-100 мкМ) в хорошо оксигенированном растворе (200 мкМ) вызывали дополнительный прирост механического напряжения СГМК, предсокращенных фенилэфрином, который

сменялся расслаблением в ответ на действие 200-400 мкМ H_2S . Однако при низкой оксигенированности раствора (40 мкМ) H_2S уже в концентрации 5 мкМ вызывал расслабление гладкомышечных препаратов. Вероятно, при высоком содержании в растворе кислорода и низком – сероводорода происходит окисление последнего, а констрикторное действие обусловлено уже не самим H_2S , а его окисленными производными, которые, вероятно, также обладают вазоактивным действием [123].

Таким образом, несмотря на многочисленные исследования влияния сероводорода на тонус кровеносных сосудов, остается много нерешенных вопросов, касающихся эффектов сероводорода в сосудистых гладких мышцах и механизмов их реализации.

ГЛАВА II

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Методики исследования

Метод механографии

Метод механографии позволяет исследовать сократительную активность (механическое напряжение) гладких мышц кровеносных сосудов. Механическое напряжение гладкомышечных сегментов изучалось в условиях, близких к изометрическим. Исследование проводилось с использованием сертифицированной четырехканальной механографической установки Myobath II и аппаратно-программного комплекса LAB-TRAX-4/16 (производство Германия).

Сосудистые сегменты получали из грудного отдела аорты 11-13 недельных крыс – самцов линии Wistar (83 особи) после умерщвления их декапитацией под глубоким наркозом (внутрибрюшинное введение пентобарбитала натрия (Nembutal, 70 мг/кг)) в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Изолированный отдел аорты помещался в физиологически сбалансированный солевой раствор (раствор Кребса). Соединительная и жировая ткань удалялись ножницами. Эндотелий удаляли вращением деревянного манипулятора внутри просвета сосуда и выделяли сегменты шириной 2-3 мм. Оставшуюся часть аорты хранили в холодильнике при 4°C. Полученные сегменты предварительно растягивали нагрузкой 500 мг и фиксировали с помощью стальных крючков в термостатируемой камере объемом 10 мл. Камеру заполняли физиологическим раствором и термостатировали при температуре 37°C.

Сегменты отмывали физиологическим раствором в течение 40-50 минут при $pH=7.4$ ($37^{\circ}C$), после чего дважды вызывали сокращение гиперкалиевым раствором Кребса (эквимолярное замещение 30 мМ NaCl на KCl). В ряде экспериментов сокращение вызывали добавлением в нормальный раствор Кребса α_1 -адреномиметика фенилэфрина (10 мкМ). Амплитуду сократительных ответов на действие гиперкалиевого раствора Кребса и фенилэфрина принимали за 100%. Амплитуду последующих сократительных ответов рассчитывали в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса или фенилэфрин.

Относительный вклад эффекта блокирования i -тых калиевых каналов определяли как отношение расслабления сосудистых сегментов в присутствии блокатора i -тых каналов к сумме расслаблений сосудистых гладких мышц (СГМ) в присутствии каждого из блокаторов калиевых каналов, согласно формуле [20]:

$$n = \frac{\Delta P_i}{\Delta P_1 + \Delta P_2 + \Delta P_3 + \Delta P_4}, \quad (1)$$

где ΔP_i – величина расслабления сосудистых сегментов (%) при действии NaHS в концентрации, близкой к EC_{50} , в присутствии блокатора исследуемых каналов; $\Delta P_{1,2,3,4}$ - величины расслабления (%) в присутствии каждого из используемых блокаторов. Соответственно, чем меньше относительная величина расслабления сосудистых сегментов в присутствии блокатора данного типа каналов, тем больше степень участия этих каналов в механизмах расслабляющего действия сероводорода.

Радионуклидный метод

Точные измерения объема клеток и входящих потоков ионов в сосудистых сегментах осложняются относительно большим объемом внеклеточного

пространства, наличием фибробластов и неоднородных СГМК. С другой стороны, долгосрочное культивирование СГМК быстро подавляет экспрессию ряда специфических генов, которые определяют их сократительный фенотип в естественных условиях [87]. Поэтому исследования проводились на свежесыведенных СГМК аорты крысы, которые использовали в 3-8 пассажах (Lonza, Walkersville, MD, США).

Активность $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта (НКСС) была изучена как буметанид-чувствительный компонент входа $^{86}\text{Rb}^+$. Клетки высевали в 24-луночные планшеты, промывали два раза с 2 мл аликвоты среды, содержащей 150 мМ NaCl и 10 мМ HEPES-трис-буфера (pH 7.4). Затем среду отсасывали и добавляли 0.25 мл раствора, содержащего 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 1 мМ CaCl_2 , 5 мМ глюкозы, 20 мМ HEPES-трис (pH 7.4) и исследуемые соединения. Через 10 мин инкубации при 37°C с 0.25 мл среды, содержащий 1-2 мкС/мл $^{86}\text{Rb}^+ \pm$ буметанид в концентрации 20 мкМ, поглощение изотопа было прекращено путем добавления 2 мл ледяной среды, содержащий 100 мМ MgCl_2 и 10 мМ HEPES-трис-буфера (pH 7.4). Клетки промывали 3 раза ледяной средой и радиоактивность среды инкубации и клеточного лизата измеряли с помощью жидкостного сцинтилляционного анализатора.

Скорость входа $\text{K}^+ (^{86}\text{Rb}^+)$ (V (нмоль на мг белка за 10 мин) рассчитывалась как $V = A / at$, где A - радиоактивность образцов (срм), a - радиоактивность $\text{K}^+ (^{86}\text{Rb})$ в среде (срм / нмоль) и t - содержание белка) измеряли с помощью модифицированного метода Лоури [166].

2.2. Растворы и реактивы

Растворы готовились на основе дистиллированной воды добавлением соответствующих реактивов (ХЧ, «Реахим», РФ).

Физиологический раствор Кребса содержал (мМ): 120.4 NaCl, 5.9 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 5.5 глюкозы, 15 C₄H₁₁O₃N [tris(oxymethyl)-aminometan].

В растворах поддерживались значения рН в пределах 7.35-7.40 и температуры 37.0±0.5°С.

Тестирующие растворы готовились путем добавления в раствор Кребса или его модификаций следующих реактивов:

1. 4-аминопиридин (Sigma);
2. гидросульфид натрия (Sigma);
3. глибенкламид (Sigma);
4. тетраэтиламмония хлорид (Serva);
5. фенилэфрин (Sigma);
6. форсколин (Sigma);
7. харибдотоксин (Sigma);
8. буметанид (Sigma);
9. ⁸⁶RbCl (Perkin Elmer Waltman, MA, USA).

Буметанид растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). ДМСО до конечной концентрации 0.1% не влиял на измеряемые показатели.

В качестве донора сероводорода использовали гидросульфид натрия (NaHS) [44, 89]. Раствор гидросульфида натрия в необходимых концентрациях готовили непосредственно перед использованием.

2.3. Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 7.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде «среднее ± ошибка среднего» ($X \pm m$). Характер распределения полученных данных определяли согласно критерию нормальности Колмогорова-Смирнова. Сформированные выборки не подчинялись закону

нормального распределения, поэтому для проверки статистических гипотез были использованы непараметрические критерии [18]. Для проверки однородности зависимых выборок был использован Т-критерий Уилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test).

ГЛАВА III

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сероводород, несмотря на известное ранее токсическое воздействие на клетку, причислен к группе внутриклеточных сигнальных молекул. Как оказалось, в концентрациях, соответствующих физиологическим, он не только не оказывает токсического влияния, но и выступает в качестве регуляторного агента, модулируя функциональное состояние клеток [144]. Восстановительные свойства молекулы H_2S заставляют предполагать возможность его взаимодействия как с молекулами, входящими в состав мембран клеток, так и с молекулами внутриклеточных сигнальных каскадов. Изменение регуляторных механизмов на молекулярном уровне, в свою очередь, приводит к изменению функциональной активности клетки в целом.

3.1. Исследование влияния сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы

Донор сероводорода $NaHS$ в физиологическом растворе Кребса при $t^\circ 37^\circ C$ и $pH 7.4$ диссоциирует с образованием 18.5 % H_2S и 81.5 % HS^- [202]. Однако, учитывая отсутствие в структуре мембраны специфических переносчиков для HS^- с одной стороны, и высокую липофильность молекулы H_2S - с другой, именно последняя считается действующим агентом в водном растворе $NaHS$ [150].

3.1.1. Влияние сероводорода на механическое напряжение сегментов аорты, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса

Гидросульфид натрия в концентрациях 5-1000 мкМ не влиял на исходное механическое напряжение (МН) гладкомышечных сегментов аорты крысы.

Эквимольное замещение в растворе Кребса 30мМ NaCl на KCl приводило к развитию поддерживаемого сократительного ответа. Гидросульфид натрия оказывал разнонаправленное действие на сосудистые ГМ аорты, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса. В концентрациях 5, 10, 50 мкМ NaHS вызывал увеличение МН сосудистых ГМ на 9.1 ± 2.5 %, 15.9 ± 3.4 % и 18.5 ± 3.5 % ($n=9$, $p<0.05$), соответственно. При действии 100 мкМ NaHS наблюдался двухфазный ответ СГМ: транзиторное увеличение МН на 27.5 ± 5.7 % с последующим его снижением на 15.3 ± 2.4 % ($n=9$, $p<0.05$) от контрольного сокращения в гиперкалиевом растворе Кребса. Дальнейшее увеличение концентрации NaHS приводило к расслаблению гладкомышечного сегмента: в ответ на добавление 500 и 1000 мкМ NaHS наблюдалось снижение МН сосудистого сегмента на 35.1 ± 7.5 % и 51.7 ± 5.0 % ($n=9$, $p<0.05$), соответственно, от величины контрольного сокращения в гиперкалиевом растворе Кребса (Рис. 1).

3.1.2. Влияние сероводорода на сократительную активность гладких мышц аорты крысы, индуцированную фенилэфрином

Фенилэфрин (ФЭ), являясь активатором α_1 -адренэргических рецепторов, стимулирует развитие сократительной реакции гладкомышечных клеток через вовлечение С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы. ФЭ в концентрации 10 мкМ вызывал сократительный ответ, сравнимый по амплитуде с сокращением, полученным в гиперкалиевом растворе Кребса, и также принимался за 100 %.

На фоне сокращения, вызванного ФЭ, добавление 5-1000мкМ NaHS оказывало дозозависимое релаксирующее действие на всем диапазоне концентраций. В ответ на добавление 5, 10, 50, 100, 500 и 1000 мкМ

гидросульфида натрия наблюдалось снижение МН сегментов, предсокращенных фенилэфрином, на 10.2 ± 4.1 %, 17.0 ± 6.2 %, 37.9 ± 7.3 %, 55.8 ± 7.2 %, 66.2 ± 7.5 % и 82.2 ± 8.1 % ($n=6$, $p<0.05$), соответственно, от величины контрольного ФЭ-индуцированного предсокращения (Рис. 2).

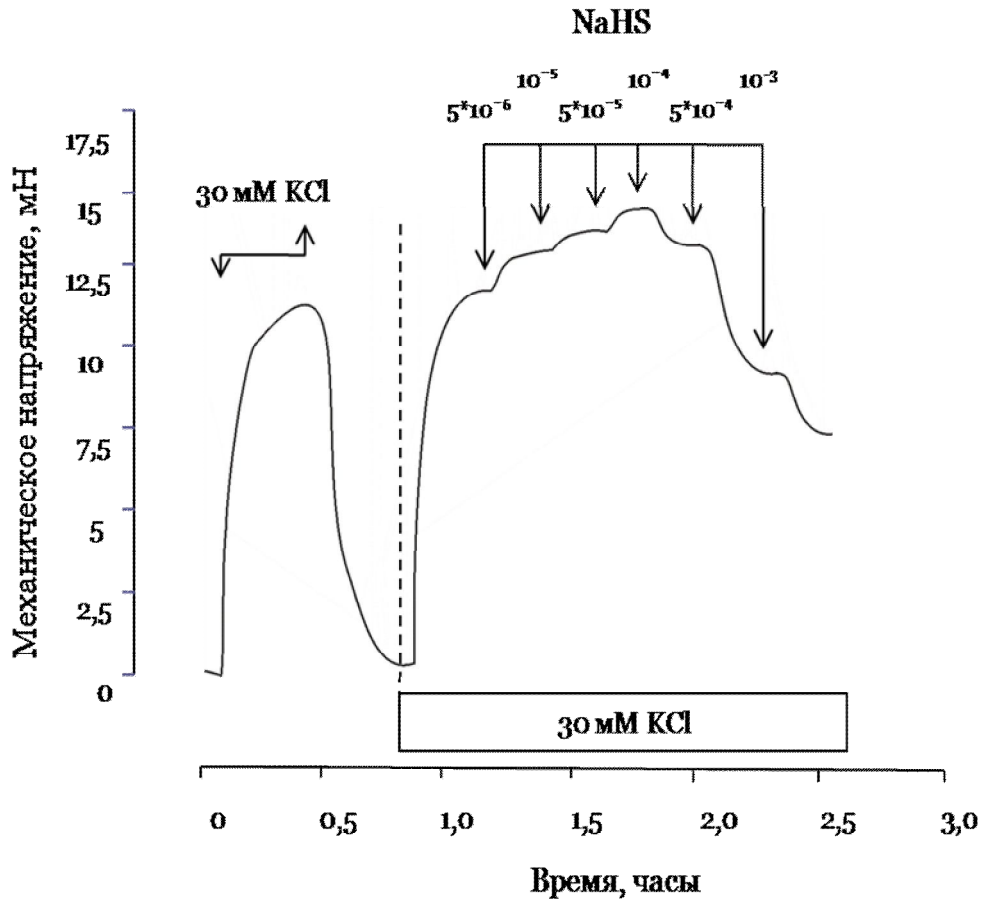


Рисунок 1. Влияние гидросульфида натрия на механическое напряжение гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором Кребса.

По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН).

Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

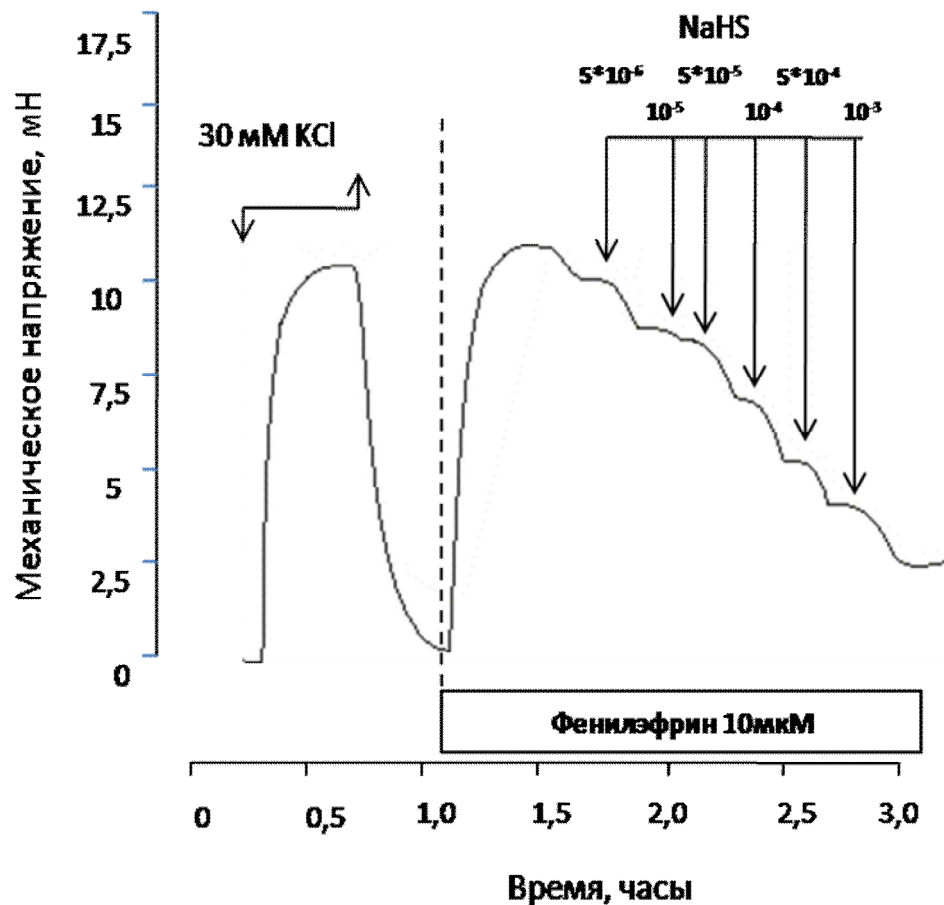


Рисунок 2. Влияние гидросульфида натрия на механическое напряжение гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного фенилэфрином.

По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН).

Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

Следовательно, направленность изменения МН сосудистых гладких мышц зависит от концентрации сероводорода и способа индукции сокращения. В самом деле, NaHS во всем диапазоне использованных концентраций дозозависимо расслаблял сосудистые сегменты, предсокращенные ФЭ. В сосудистых сегментах предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, NaHS в малых (до 100 мкМ) концентрациях увеличивал, а в больших (500, 1000 мкМ) снижал МН сегментов

аорты крысы. Подобные различия в эффектах, оказываемых сероводородом на СГМК, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса и фенилэфрином, вероятно, связаны с различными механизмами, лежащими в основе предсокращения. В частности, с активацией фенилэфрином С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы, а также активацией сигнального пути, опосредованного метаболизмом мембранных фосфоинозитидов [3].

3.2. Исследование механизмов констрикторного действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы аорты крысы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса

3.2.1. Роль кофеин-чувствительного кальциевого депо саркоплазматического ретикулума сосудистых гладкомышечных клеток в механизмах констрикторного действия сероводорода на изолированные сегменты аорты крысы

Кофеин (1 мМ) вызывал транзиторное увеличение МН сосудистых гладкомышечных сегментов, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, на 7.5 ± 3.3 % ($n=6$, $p<0.05$) с последующим его снижением на 22.0 ± 2.8 % ($n=6$, $p<0.05$) от величины контрольного сокращения. На этом фоне констрикторное действие 5, 10, 50, 100 мкМ NaHS изменялось на релаксирующее. Величина расслабления составила 3.9 ± 1.2 %; 5.1 ± 1.9 %; 11.8 ± 4.6 % и 19.6 ± 3.9 % ($n=6$, $p<0.05$), соответственно, от величины контрольного сокращения в гиперкалиевом растворе Кребса. Расслабляющее действие 500 мкМ NaHS статистически значимо не изменялось, в то время как действие 1000 мкМ NaHS усиливалось: величина расслабления составила 73.8 ± 6.0 % ($n=6$, $p<0.05$) от величины сокращения СГМ в гиперкалиевом растворе Кребса (рис. 3).

Таким образом, истощение кофеин-чувствительного кальциевого депо саркоплазматического ретикула (СПР) СГМК устраняло констрикторное действие низких концентраций сероводорода. Соответственно, можно предположить, что малые концентрации (5-100 мкМ) NaHS индуцируют сократительные ответы сосудистых сегментов за счет освобождения ионов Ca^{2+} из СПР. Вместе с тем, Ca^{2+} является кофактором, необходимым для открывания Ca^{2+} -активируемых хлорных каналов. Активация входящего хлорного тока ведет к деполяризации мембраны СГМК [50]. Наряду с этим, в исследованиях Kim J.A. [121] и Shin J.-H. [185] было установлено, что увеличение цитоплазматической концентрации Ca^{2+} активирует NKCC в СГМК.

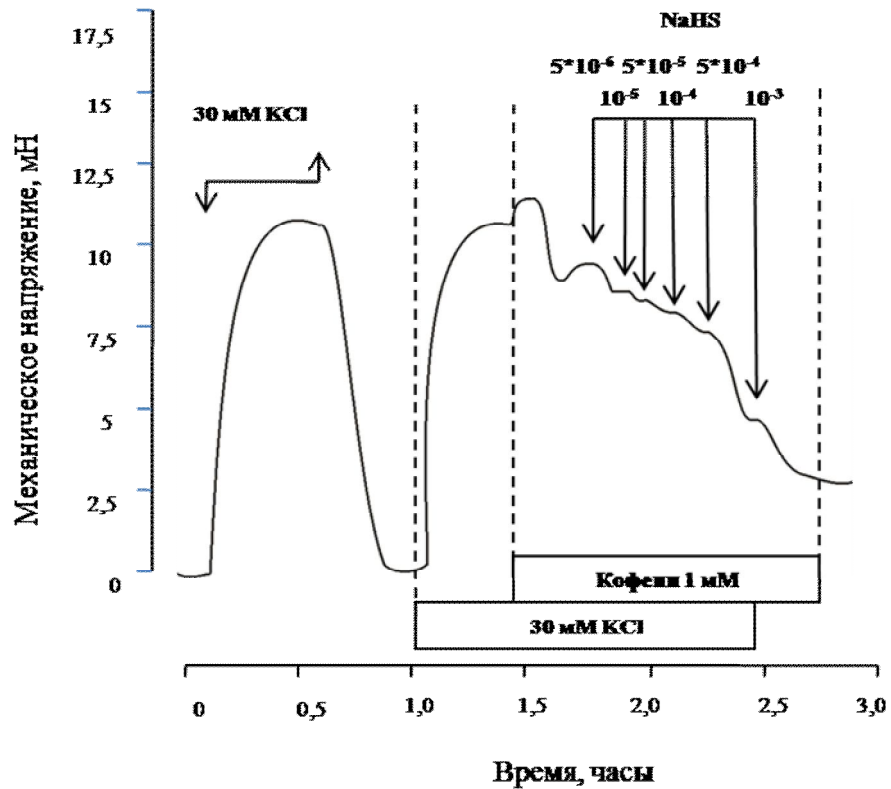


Рисунок 3. Влияние гидросульфида натрия на механическое напряжение сосудистого сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором Кребса в присутствии кофеина. По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН). Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

3.2.2. Исследование роли Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ - котранспорта в реализации констрикторного действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса

Для исследования роли Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ - котранспорта в механизмах действия сероводорода на сократительную активность гладкомышечных сегментов аорты крысы использовали ингибитор НКСС буметанид. Предобработка в течение 15 мин сосудистых гладких мышц буметанидом (100 мкМ) приводила к достоверному снижению МН сосудистых ГМ, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, на 19.7 ± 1.9 % ($n=7$, $p<0.05$) от величины контрольного сокращения. Буметанид устранял констрикторное действие 5, 10, 50, 100 мкМ NaHS. Напротив, в этих случаях МН сосудистых сегментов уменьшалось на 4.1 ± 1.2 % ($n=5$, $p>0.5$); 7.9 ± 1.9 % ($n=7$, $p<0.05$); 6.4 ± 2.8 % ($n=5$, $p<0.05$), 66.2 ± 5.8 % ($n=6$; $p<0.05$), соответственно, от величины контрольного сокращения сосудистых сегментов в гиперкалиевом растворе Кребса.

Гидросульфид натрия в концентрации 500 мкМ расслаблял гладкомышечные сегменты аорты крысы на 81.0 ± 4.0 % ($n=5$, $p<0.05$) от контрольного сокращения в гиперкалиевом растворе Кребса. Добавление 1000 мкМ NaHS дополнительного изменения МН не вызывало (Рис. 4).

Полученные данные свидетельствуют о вовлечении Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ - котранспортера в механизмы констрикторного действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы.

Для верификации роли этого ионного обменника в развитии сократительной реакции СГМ в ответ на действие сероводорода далее оценивали изменение активности НКСС при действии NaHS радионуклидным методом.

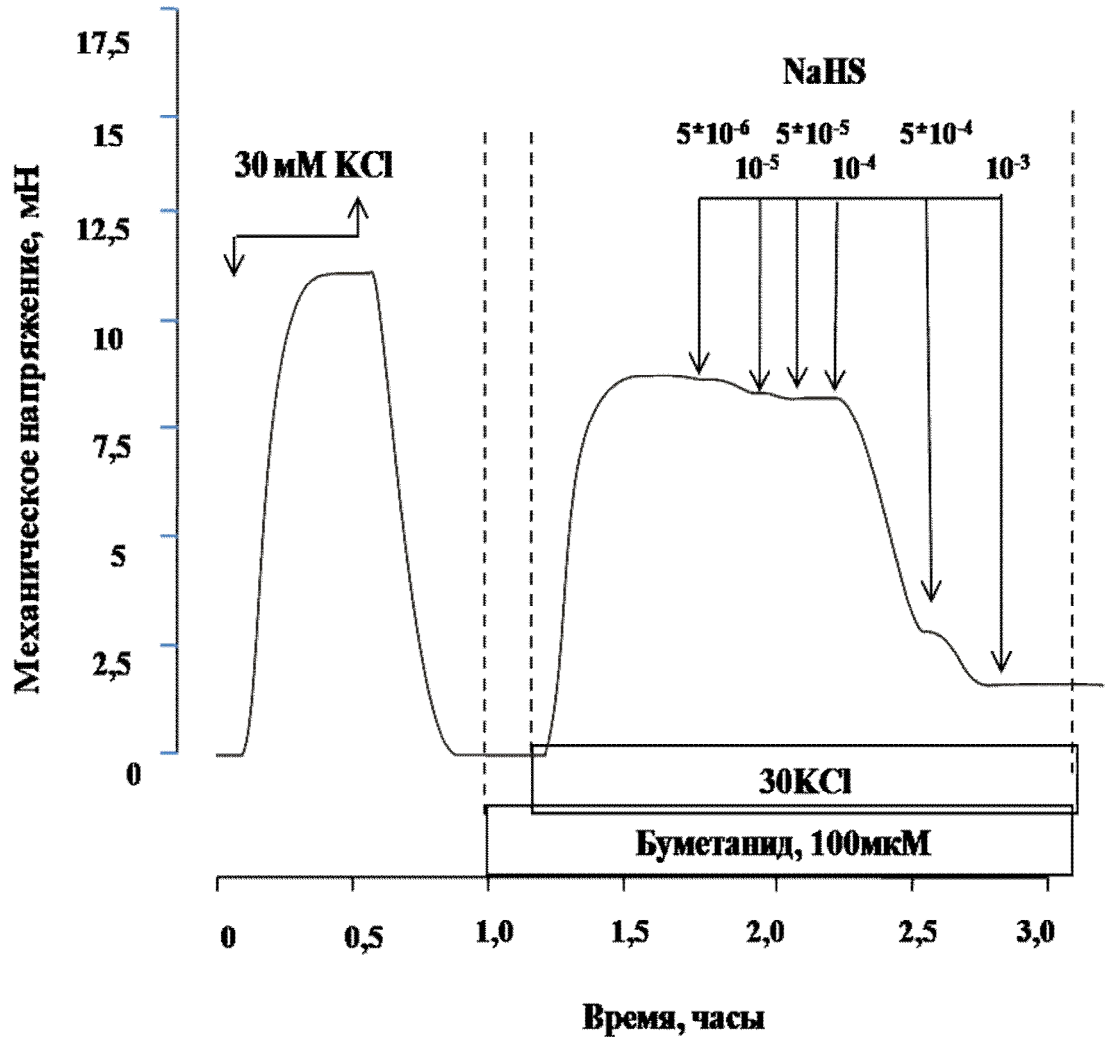


Рисунок 4. Влияние гидросульфида натрия на сократительную активность гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором Кребса в присутствии буметанида.

По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН).

Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

3.2.3. Исследование влияния сероводорода на активность Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспорта

Активность НКСС была изучена как буметанид-чувствительный компонент входа $^{86}\text{Rb}^+$. Активность обменника в отсутствие NaHS принималась за 100%. Добавление в среду инкубации 5, 10 и 500 мкМ NaHS не оказывало статистически значимого влияния на активность НКСС. Однако в присутствии 50 и 100 мкМ NaHS активность НКСС достоверно увеличивалась, составив 146.0 ± 7.0 % ($n=12$, $p<0.05$) и 138.0 ± 11.0 % ($n=12$, $p<0.05$), соответственно, от контрольного значения (Табл. 1).

Таблица 1

Влияние гидросульфида натрия на активность Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспорта

<i>Концентрация гидросульфида натрия, мкМ</i>	<i>Активность Na^+, K^+, 2Cl^- - котранспорта, %</i>
NaSH, 0 (контроль)	100
NaSH, 5	111.0 ± 11.0
NaSH, 10	127.0 ± 8.0
NaSH, 50	$146.0 \pm 7.0^*$
NaSH, 100	$138.0 \pm 11.0^*$
NaSH, 500	101.0 ± 9.0

$\bar{X} \pm m$, полученные в трех независимых экспериментах, выполненных в четырех пробах. * - $p<0.05$ в сравнении с контролем.

Полученные данные свидетельствуют об активации Na^+ , K^+ , 2Cl^- котранспортера низкими (констрикторными) концентрациями сероводорода.

Ранее нами было показано, что активация НКСС является главным

молекулярным событием в обеспечении сократительных реакций изолированных сегментов аорты крысы на действие неизоосмотических растворов [50, 127]. Можно полагать, что НКСС является одной из ключевых мишеней, через которую реализуется сократительное действие сероводорода на СГМ.

В состоянии покоя гладкомышечных клеток НКСС обеспечивает внутрь направленный поток ионов и поддерживает внутриклеточную концентрацию Cl^- ($[\text{Cl}]_i$) выше значений, следующих из уравнения Нернстовского равновесного потенциала. В отличие от большинства электровозбудимых клеток, где доминирующую роль в генерации мембранного потенциала покоя играет калиевая проводимость мембраны, в СГМК значения констант проницаемости мембраны для K^+ и Cl^- очень близки, что является косвенным свидетельством вовлечения НКСС-опосредованного транспорта Cl^- в регуляцию величины мембранного потенциала и зависящего от него сокращения СГМК. Действительно, как показывают многочисленные эксперименты, в том числе выполненные в нашей лаборатории, ингибитор НКСС буметанид уменьшает $[\text{Cl}]_i$ [71], гиперполяризует мембрану СГМК и уменьшает число открытых потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа [50, 127, 169]. Эти данные объясняют механизмы, лежащие в основе угнетающего действия ингибиторов НКСС на базальный тонус [166, 111], на сокращения ГМ, вызванные деполяризацией мембраны гиперкалиевым раствором, электрическими стимулами [127] и физиологически активными веществами [170, 124], а также констрикторных эффектов активации этого котранспорта [50]. Определенную роль в этом процессе может играть освобождение Ca^{2+} из СПР СГМК, который является кофактором открывания Ca^{2+} -активируемых Cl^- -каналов [50, 127]. Роль и механизмы влияния модуляции активности НКСС на МН СГМК по-прежнему спорны. Однако важно то, что они отражают вклад различных регуляторных путей в генерацию сокращения и мозаику их взаимодействия.

Этим, по-видимому, объясняется и отсутствие констрикторного действия

сероводорода на сосудистые сегменты, предсокращенные ФЭ. В механизмы сокращения фенилэфрином сосудистых ГМ вовлекается протеинкиназа С (ПК-С). В литературе имеются противоречивые данные о влиянии ПК-С на активность НКСС. Ряд исследователей показали увеличение протеинкиназой С активности этого котранспорта. В работах W.S Marshall продемонстрировано его угнетение при активации ПК-С [149]. Важным является сам факт изменения протеинкиназой С активности НКСС. В самом деле, как активированный, так и ингибированный протеинкиназой С Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспортер будет проявлять иную, чем интактный переносчик, чувствительность к действию сероводорода. Из наших экспериментов следует, что, если сероводород при действии на предсокращенную ФЭ сосудистую гладкую мышцу и влиял на активность НКСС, то в пределах, которые не явились значимыми для изменения МН СГМК.

3.3. Исследование роли калиевой проводимости мембраны в механизмах действия сероводорода на сократительную активность сосудистых гладких мышц, индуцированную гиперкалиевым раствором Кребса

Многочисленные исследования указывают на калиевые каналы мембраны СГМК как основную мишень сероводорода, через воздействие на которую реализуется релаксирующее действие этого газотрансмиттера на сосудистые гладкие мышцы. Для выявления участия изменений основных компонентов калиевой проводимости в реализации эффектов H_2S использовались соответствующие блокаторы калиевых каналов.

Тестировалось действие NaHS в концентрации 500 мкМ, близкой к EC_{50} для расслабляющего сосудистые ГМ действия сероводорода. Величина расслабления составила 35.1 ± 7.5 % ($n=6$, $p<0.05$) от амплитуды контрольного сокращения, вызванного гиперкалиевым раствором Кребса.

3.3.1. Влияние тетраэтиламмония на релаксирующее действие гидросульфида натрия при сокращениях сосудистых гладких мышц, вызванных гиперкалиевым раствором Кребса

Блокатор кальций-активируемых и потенциал-зависимых калиевых каналов тетраэтиламмоний (ТЭА) в концентрации 10 мМ увеличивал МН гладкомышечных сегментов аорты крысы, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, на 9.1 ± 1.0 % ($n=6$, $p < 0.05$). На этом фоне расслабляющее действие 500 мкМ NaHS достоверно снижалось, составив 13.9 ± 3.2 % ($n=6$, $p < 0.05$) от контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (Рис. 5).

Поскольку ТЭА в миллимолярных концентрациях примерно в равной степени блокирует Ca^{2+} -активируемые K^+ каналы большой (BK_{Ca}), промежуточной (IK_{Ca}) и малой (SK_{Ca}) проводимости, а также потенциал-зависимые K^+ -каналы мембраны СГМК [183], полученные нами данные свидетельствуют в пользу предположения о том, что релаксирующее действие NaHS на сосудистые сегменты, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса, опосредовано активацией Ca^{2+} -активируемых и потенциал-зависимых K^+ -каналов мембраны СГМК.

Для выявления вклада каждого из этих компонентов калиевой проводимости мембраны в релаксирующее действие сероводорода далее использовали селективные блокаторы калиевых каналов.

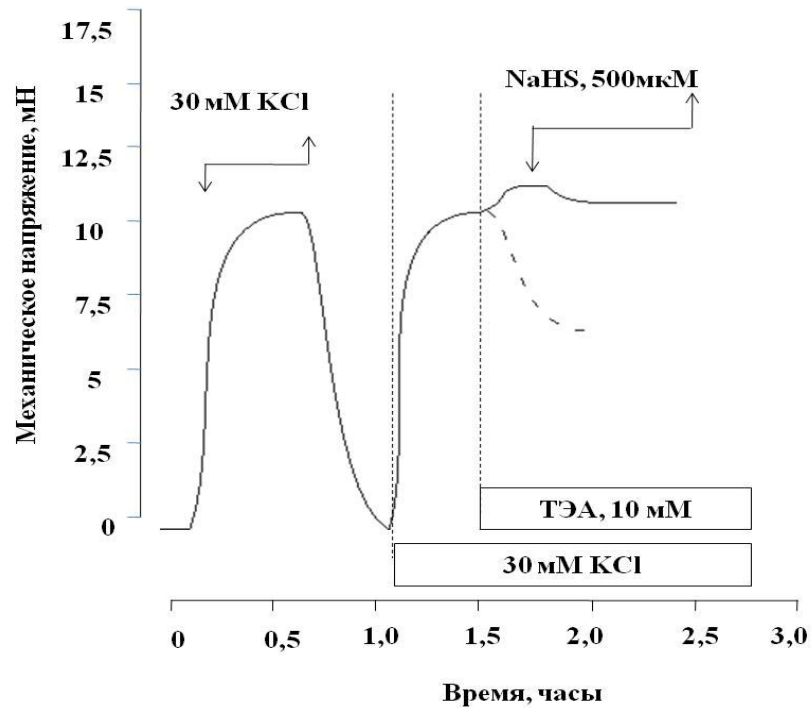


Рисунок 5 Влияние гидросульфида натрия (500 мкМ) на сократительную активность гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором Кребса в присутствии тетраэтиламмония.

По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН).

Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

Пунктирная линия – расслабление сегмента при действии NaHS (500 мкМ) в отсутствие блокатора калиевых каналов.

3.3.2. Роль потенциал-зависимых калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии гидросульфида натрия на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса

Селективный блокатор потенциал-зависимых калиевых каналов 4-аминопиридин (4-АП) в концентрации 1 мМ увеличивал МН сосудистых

сегментов, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, на 27.9 ± 5.5 % ($n=5$, $p < 0.05$) от величины контрольного сокращения. Величина расслабления в ответ на аппликацию 500 мкМ NaHS статистически значимо не изменялась и составила 29.5 ± 5.3 % ($n=4$, $p > 0.05$) от величины сокращения в гиперкалиевом растворе Кребса (Рис.6).

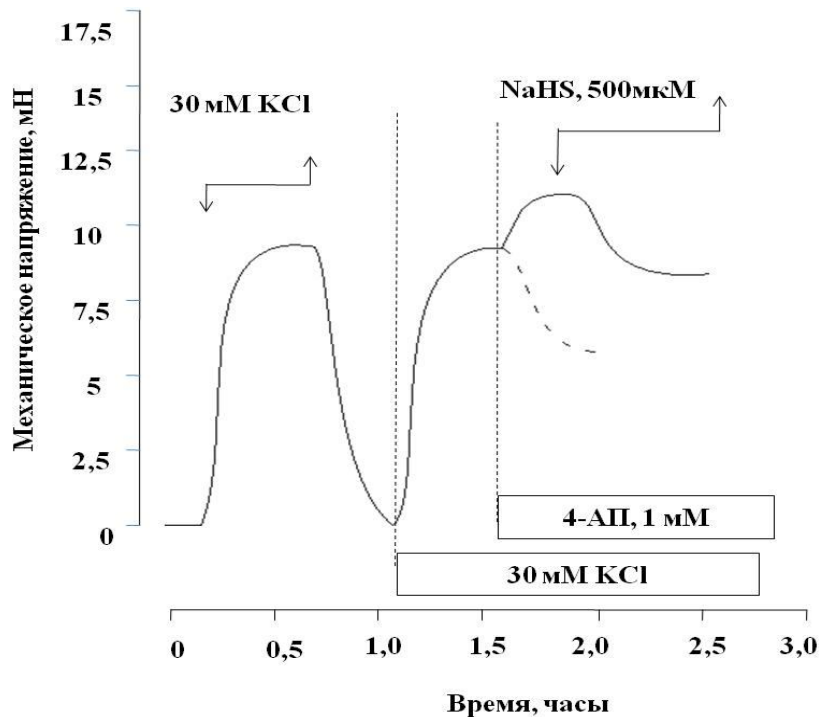


Рис. 6. Влияние гидросульфида натрия (500 мкМ) на сократительную активность гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором Кребса в присутствии 4-аминопиридина.

По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН).

Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

Пунктирная линия – расслабление сегмента при действии NaHS (500 мкМ) в отсутствие блокатора калиевых каналов.

3.3.3. Роль кальций-активируемых калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии гидросульфида натрия на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса

Блокатор Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов большой проводимости харибдотоксин (ХТ) в концентрации 0.1 мкМ не изменял величину предсокращения сегментов аорты крысы при действии гиперкалиевого раствора Кребса. Релаксирующее действие 500 мкМ NaHS достоверно усиливалось, составив $56.4 \pm 9.6\%$ ($n=4$; $p<0.05$) от контрольного сокращения в гиперкалиевом растворе (Рис. 7).

Следовательно, ВКСа – каналы не участвуют в релаксирующем действии сероводорода на СГМ, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса.

3.3.4. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии гидросульфида натрия на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса

Для блокирования АТФ-чувствительного компонента калиевой проводимости мембраны гладкомышечных клеток использовали селективный блокатор K^+ _{АТФ}-каналов глибенкламид (ГБ). ГБ в концентрации 10 мкМ снижал величину МН гладкомышечных препаратов, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, на $4.5 \pm 1.6\%$ ($n=6$, $p<0.05$) от величины контрольного сокращения. В присутствии ГБ релаксирующее действие 500 мкМ NaHS усиливалось, составив $54.3 \pm 6.6\%$ ($n=6$, $p<0.05$) от контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (Рис. 8).

Таким образом, K^+ _{АТФ}-каналы также не участвуют в расслаблении СГМ, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, при действии сероводорода.

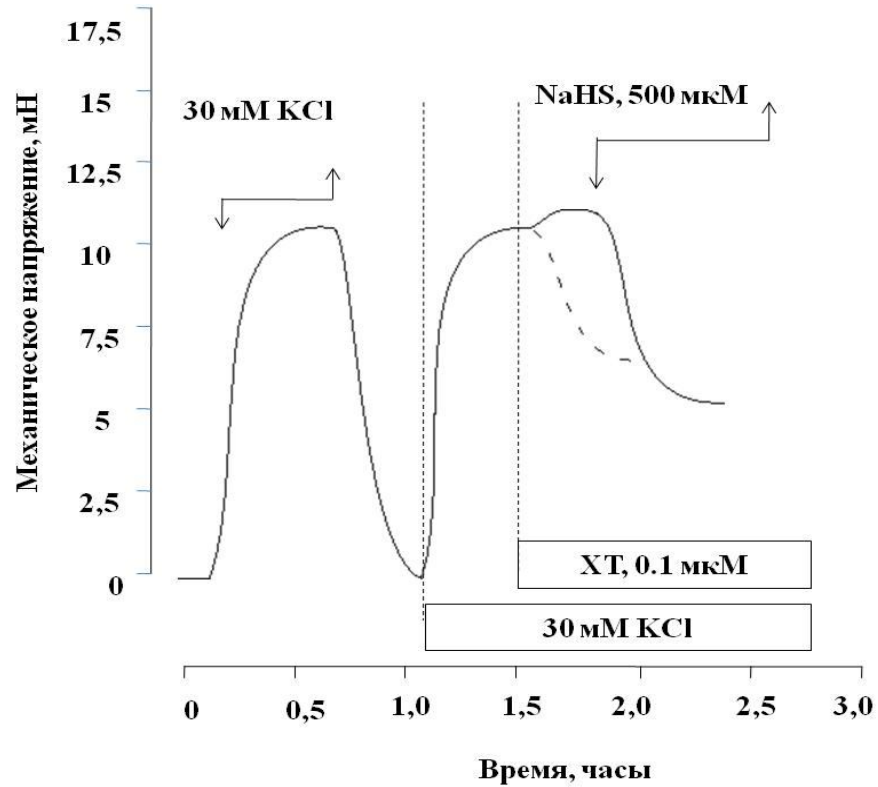


Рисунок 7. Влияние гидросульфида натрия (500 мкМ) на сократительную активность гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором Кребса в присутствии харибдотоксина.

По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН).

Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

Пунктирная линия – расслабление сегмента при действии NaHS (500 мкМ) в отсутствие блокатора калиевых каналов.

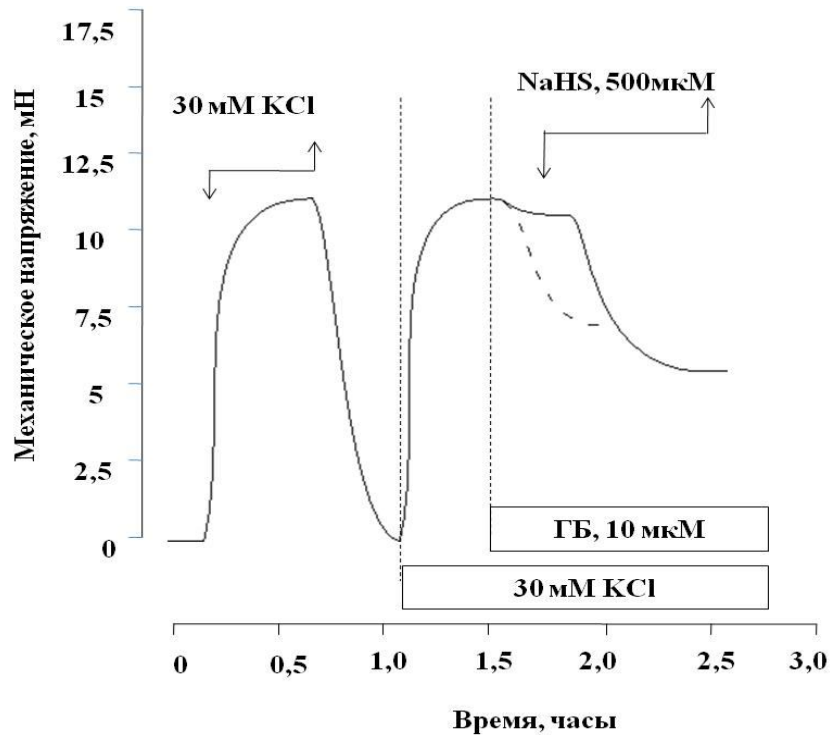


Рисунок 8. Влияние гидросульфида натрия (500 мкМ) на сократительную активность гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором Кребса в присутствии глибенкламида.

По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН).

Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

Пунктирная линия – расслабление сегмента при действии NaHS (500 мкМ) в отсутствии блокатора калиевых каналов.

3.3.5. Определение относительного вклада различных типов калиевых каналов в релаксирующее действие сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса

Количественное выражение относительного вклада исследуемых типов калиевых каналов в механизмы расслабления сероводородом сосудистых сегментов, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, оценивали по формуле (1). Результаты представлены в табл.2.

Таблица 2

Относительный вклад калиевых каналов в механизмы релаксирующего действия сероводорода на сокращения сосудистых сегментов, вызванные гиперкалиевым раствором Кребса

Блокатор	Относительная величина расслабления
ТЭА (10мМ)	0.09
4-АП (1мМ)	0.19
ГБ (10мкМ)	0.35
ХТ (0.1 мкМ)	0.37

ТЭА - тетраэтиламмоний, ГБ - глибенкламид, 4-АП - 4-аминопиридин, ХТ – харибдотоксин.

Как следует из представленных в таблице данных, основную роль в релаксирующем действии сероводорода играют калиевые каналы, чувствительные к ТЭА.

Как указывалось выше, ТЭА примерно в равной степени блокирует $ВК_{Ca}$, IK_{Ca} и SK_{Ca} , а также потенциал-зависимые калиевые каналы. Все эти каналы представлены в мембране СГМК [183]. В то же время, отсутствие влияния

блокатора потенциал-зависимых калиевых каналов 4-АП на расслабление СГМ при действии сероводорода указывает на $K^+_{Ca^{2+}}$ - каналы мембраны СГМК как ключевое звено в механизмах релаксирующего действия сероводорода на ГМ аорты крысы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса. Эксперименты, проведенные с харибдотоксином, позволяют исключить участие в этом процессе Ca^{2+} - активируемых калиевых каналов большой проводимости. Таким образом, угнетающее действие ТЭА обусловлено блокированием IK_{Ca} и/или SK_{Ca} . На сегодняшний день наиболее вероятным представляется участие в механизмах расслабления каналов из группы SK_{Ca} . В самом деле, K. Gauthier et al. (2004) методом whole-cell clamp зарегистрировали выходящие K^+ - токи в изолированных ГМК аорты крысы, которые подавлялись апамином. В inside-out patches мембраны этих клеток апамин ингибировал кальциевую активацию SK_{Ca} , что свидетельствует о том, что активация именно этих каналов является причиной гиперполяризации и релаксации ГМ аорты крысы [86].

Несмотря на многочисленные данные, указывающие на участие АТФ-чувствительных калиевых каналов в механизмах релаксирующего действия сероводорода на ГМК сосудов [148, 201], их вклад в расслабление СГМК, предсокращенных деполяризацией мембран клеток гиперкалиевым раствором, установлен не был.

3.4. Исследование роли калиевой проводимости мембраны в механизмах действия сероводорода на сократительную активность сосудистых гладких мышц, индуцированную фенилэфрином

Для исследования роли калиевой проводимости мембраны СГМК в релаксирующем действии сероводорода на сосудистые сегменты, предсокращенные фенилэфрином, использовали NaHS в концентрации 100 мкМ,

при которой он оказывал расслабляющее действие, близкое к EC_{50} . Величина расслабления при этом составила 55.8 ± 7.2 % ($n=6$, $p<0.05$).

3.4.1. Влияние тетраэтиламмония на релаксирующее действие гидросульфида натрия при сокращениях сосудистых гладких мышц, вызванных фенилэфрином

Блокатор кальций-активируемых и потенциал-зависимых калиевых каналов тетраэтиламмоний (10 мМ) увеличивал МН гладкомышечных сегментов, предсокращенных 10 мМ ФЭ, на 30.1 ± 12.6 % ($n=6$, $p<0.05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. На фоне действия ТЭА (10 мМ) величина расслабления гладкомышечных сегментов аорты крысы в ответ на действие 100 мкМ NaHS достоверно снижалась и составила 13.8 ± 5.2 % ($n=6$, $p<0.05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения (Рис. 9).

Полученные данные указывают на возможную роль $K^+_{Ca^{2+}}$ - каналов и K^+_v – каналов в механизмах релаксирующего действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы.

3.4.2. Роль потенциал-зависимых калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии гидросульфида натрия на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином

Для выявления роли потенциал-зависимого компонента калиевой проводимости мембраны в механизмах релаксации СГМК при действии сероводорода использовали селективный блокатор потенциал-зависимых калиевых каналов 4-АП.

4-АП в концентрации 1 мМ увеличивал МН сосудистых гладких мышц, предсокращенных фенилэфрином, на 27.9 ± 5.5 % ($n=7$, $p<0.05$) от контрольного

ФЭ-индуцированного сокращения. В присутствии 4-АП релаксирующее действие 100 мкМ NaHS достоверно снижалось: его величина составила $16.2 \pm 2.7\%$ ($n=7$, $p < 0.05$) от контрольного фенилэфрин-индуцированного сокращения (Рис. 10).

Таким образом, релаксирующее действие сероводорода на СГМ аорты крысы зависит от работы K_v – каналов мембраны СГМК.

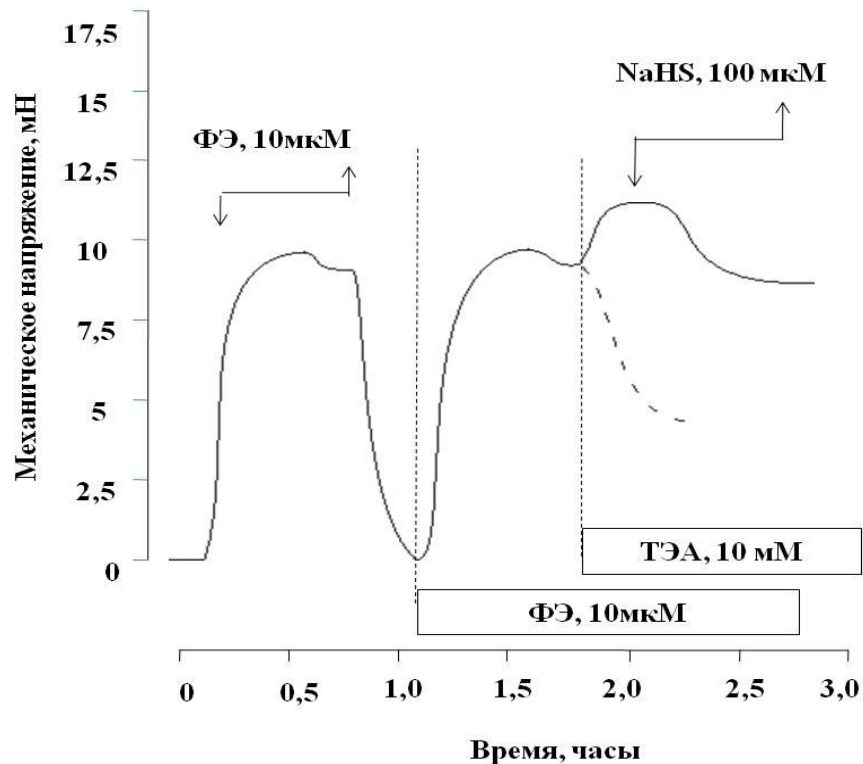


Рисунок 9. Влияние гидросульфида натрия (100 мкМ) на сократительную активность гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного фенилэфрином в присутствии тетраэтиламмония.

По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН).

Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

Пунктирная линия – расслабление сегмента при действии NaHS (100 мкМ) в отсутствие блокатора калиевых каналов.

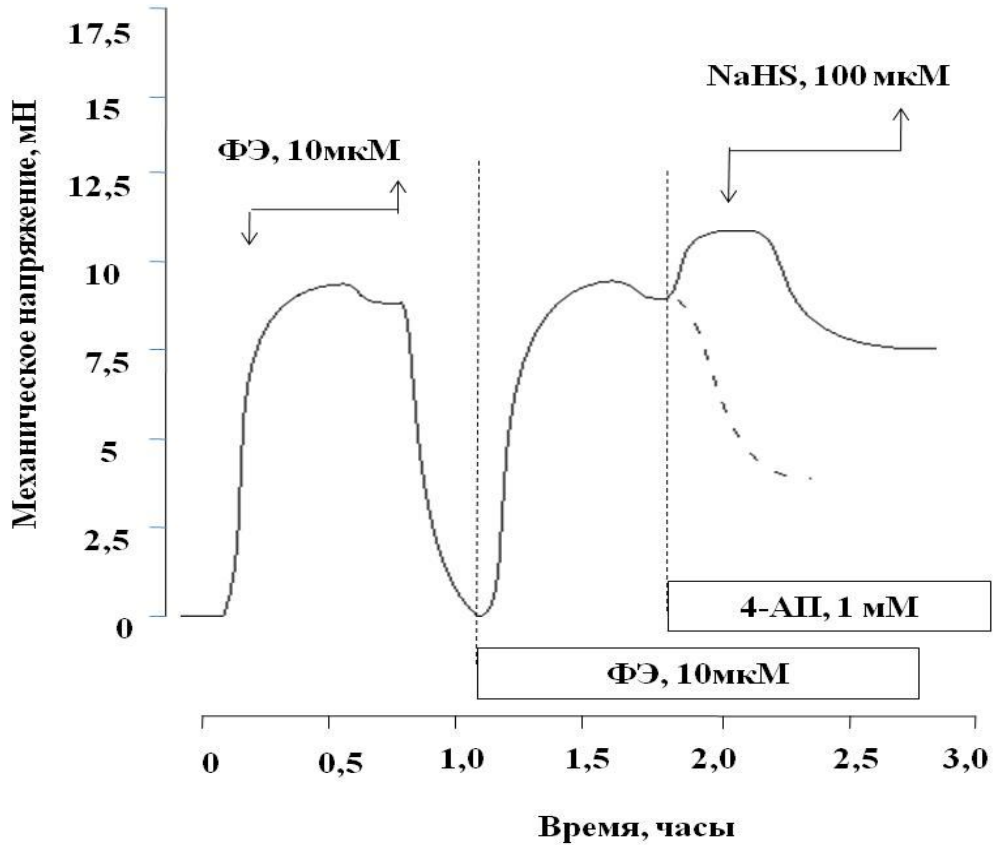


Рисунок 10. Влияние гидросульфида натрия (100 мкМ) на сократительную активность гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного фенилэфрином в присутствии 4-аминопиридина.

По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН).

Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

Пунктирная линия – расслабление сегмента при действии NaHS (100 мкМ) в отсутствие блокатора калиевых каналов.

3.4.3. Роль кальций-активируемых калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии гидросульфида натрия на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином

Блокатор кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости харибдотоксин (0.1 мкМ) вызывал дополнительное увеличение величины механического напряжения гладкомышечных сегментов аорты крысы, предсокращенных ФЭ, на 13.3 ± 1.9 % ($n=4$, $p < 0.05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. Однако величина расслабления сосудистых гладких мышц при действии 100 мкМ NaHS статистически значимо не изменялась (Рис. 11).

Полученные данные исключают участие кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости в механизмах релаксирующего действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные активацией α_1 -адренорецепторов фенилэфрином.

3.4.4. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии гидросульфида натрия на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином

Для выявления вклада АТФ-чувствительных калиевых каналов в индуцированном H_2S расслаблении СГМ использовали селективный блокатор K^+ АТФ-каналов глибенкламид (10 мкМ). ГБ (10 мкМ) снижал величину МН гладкомышечных сегментов аорты крысы, предсокращенных фенилэфрином (10 мкМ), на 12.4 ± 4.0 % ($n=8$, $p < 0.05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. Релаксирующее действие 100 мкМ NaHS на гладкие мышцы аорты крысы отсутствовало (Рис. 12).

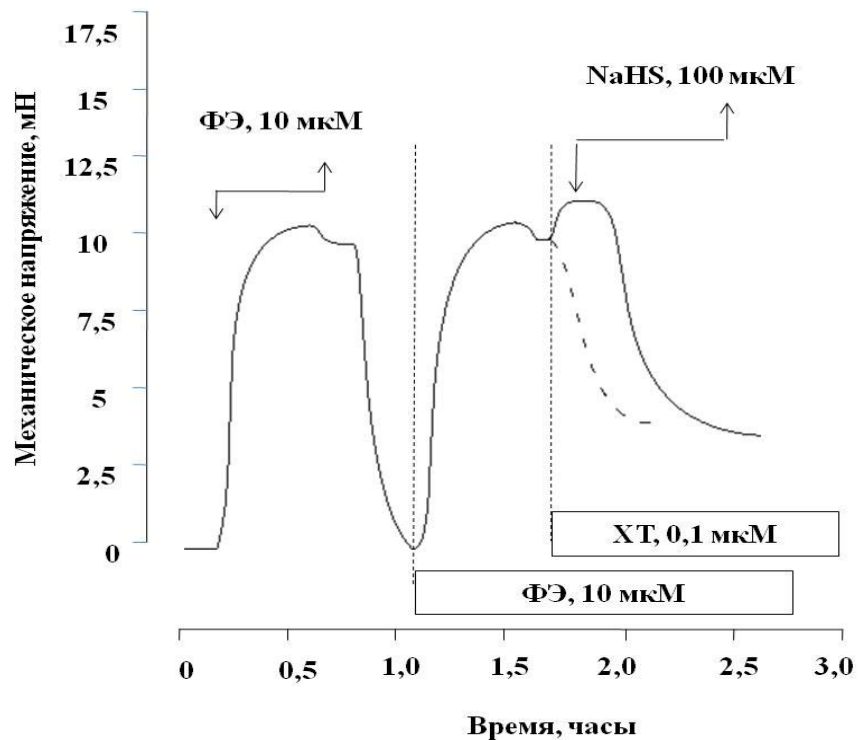


Рисунок 11. Влияние гидросульфида натрия (100 мкМ) на сократительную активность гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного фенилэфрином в присутствии харибдотоксина.

По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН).

Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

Пунктирная линия – расслабление сегмента при действии NaHS (100 мкМ) в отсутствии блокатора калиевых каналов.

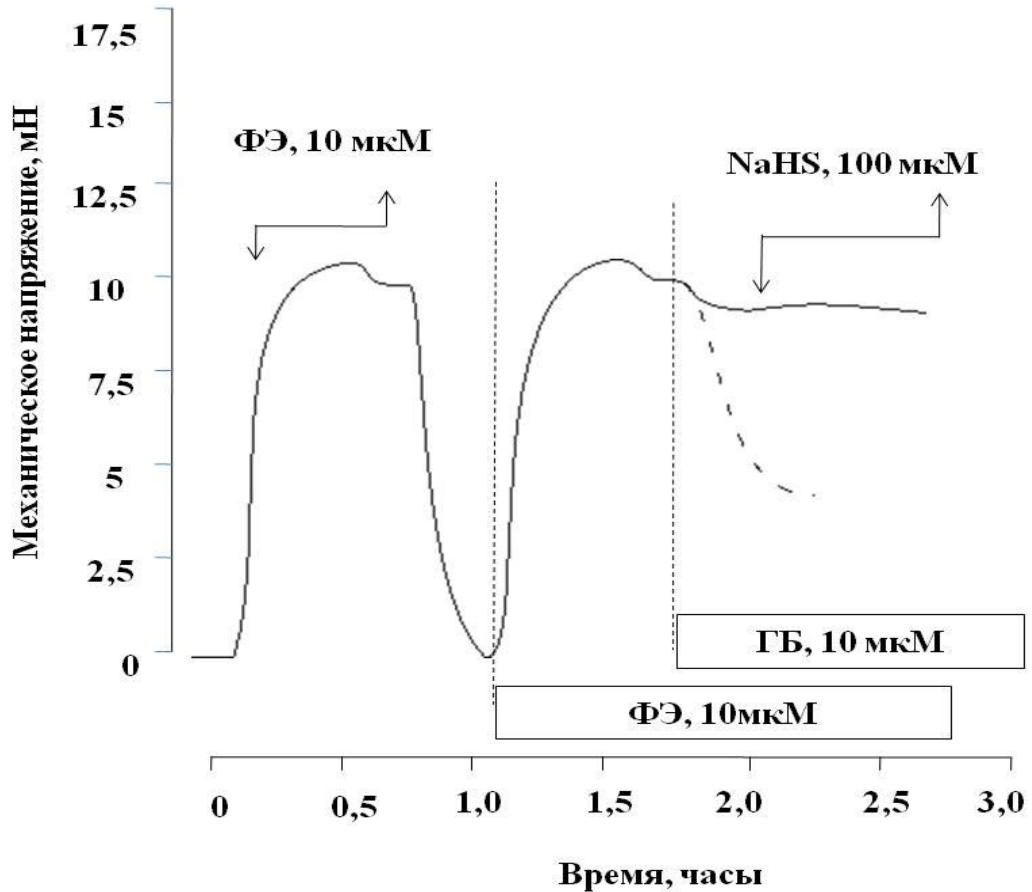


Рисунок 12. Влияние гидросульфида натрия (100 мкМ) на сократительную активность гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного фенилэфрином в присутствии глибенкламида.

По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН).

Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

Пунктирная линия – расслабление сегмента при действии NaHS (100 мкМ) в отсутствии блокатора калиевых каналов.

3.4.5. Определение относительного вклада различных типов калиевых каналов в релаксирующее действие сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином

Количественное выражение относительного вклада исследуемых типов калиевых каналов в механизмы расслабления сероводородом сосудистых сегментов, предсокращенных фенилэфрином, рассчитывали по формуле (1). Результаты представлены в табл.3.

Таблица 3

Относительный вклад калиевых каналов в релаксирующее действие сероводорода на сокращения сосудистых сегментов, вызванные фенилэфрином

Блокатор	Относительная величина расслабления
ТЭА (10мМ)	0,19
4-АП (1мМ)	0,23
ГБ (10мкМ)	0,01
ХТ (0,1 мкМ)	0,57

ТЭА - тетраэтиламмоний, ГБ - глибенкламид, 4-АП - 4-аминопиридин, ХТ – харибдотоксин.

Таким образом, согласно полученным нами данным, блокатор Ca^{2+} -активируемых и потенциал-зависимых K^{+} -каналов ТЭА снижал величину расслабления СГМ при действии 100 мкМ. В то же время селективное блокирование потенциал-зависимых K^{+} -каналов 4-аминопиридином ослабляло индуцированную H_2S релаксацию ГМК аорты практически в такой же степени, что и совместное выключение Ca^{2+} -активируемых и потенциал-зависимых K^{+} -

каналов тетраэтиламмонием. Блокирование VK_{Ca} – каналов харибдотокисном не оказывало статистически значимого влияния на величину H_2S -индуцированной релаксации. Это свидетельствует о вкладе K_v -каналов в механизмы релаксирующего действия сероводорода на СГМ, предсокращенные ФЭ.

Однако, как следует из экспериментальных данных и данных, представленных в таблице 3, относительная величина расслабления СГМ при блокировании АТФ-чувствительных калиевых каналов глибенкламидом стремится к нулю. Следовательно, главенствующую роль в механизмах расслабления сероводородом СГМК аорты крысы играет открывание АТФ-чувствительных калиевых каналов. Полученные данные согласуются с данными Rui Wang [108, 201], который назвал АТФ-чувствительные калиевые каналы мембраны СГМК главной мишенью для сероводорода.

Заключение

Одним из основных физиологических эффектов сероводорода является вазорелаксация. В наших исследованиях было установлено разнонаправленное действие сероводорода на МН сосудистых сегментов, которое зависело от концентрации газотрансмиттера и природы предсокращения. Документировано, что при сокращении, вызванном действием ФЭ, H_2S оказывал только дозозависимое релаксирующее действие на СГМ, а в условиях предсокращения сосудистых сегментов гиперкалиевым раствором Кребса низкие концентрации $NaHS$ (1-100 мкМ) оказывали констрикторное действие на СГМК, которое обращалось на релаксирующее при действии более высоких концентраций донора сероводорода. Выявленные различия влияния сероводорода на МН сосудистых сегментов, по-видимому, связаны с различной природой этих сокращений. В самом деле, увеличение МН ГМК, вызванное деполяризацией мембраны гиперкалиевым раствором Кребса, обусловлено оперированием только кальций-кальмодулиновой (Ca-КМ) ветви кальциевой сигнальной системы. Тогда как в индукцию и поддержание сокращения, вызванного ФЭ, вовлечены обе ее ветви: Ca-КМ и С-киназная.

В литературе отсутствуют данные о роли НКСС в механизмах действия сероводорода. Однако результаты наших исследований свидетельствуют о том, что данный котранспортер является основным эффектором констрикторного влияния сероводорода. В самом деле, ингибитор НКСС буметанид устранял констрикторное действие сероводорода на СГМК, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса. В радиоизотопных исследованиях получены прямые доказательства активации сероводородом буметанид-чувствительного компонента транспорта $^{86}Rb^+$ в изолированные СГМК аорты крысы, который является маркером активности НКСС. Цепь молекулярных событий,

опосредующих сократительную реакцию СГМК при действии H_2S , может заключаться в следующем: активация сероводородом НКСС увеличивает электрохимический потенциал Cl^- , усиливает входящий хлорный ток, обуславливающий деполяризацию мембраны, открывание дополнительного числа потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа и увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [50, 127]. Как показали наши исследования, определенную роль в этом процессе играет освобождение сероводородом из саркоплазматического ретикулума СГМК ионов Ca^{2+} , которые являются кофактором открывания Ca^{2+} -активируемых Cl^- -каналов.

Согласно полученным нами данным, расслабление СГМК аорты крысы при действии сероводорода связано с увеличением калиевой проводимости мембраны указанных клеток. Для расслабления сероводородом СГМК, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, ключевую роль играет открывание кальций-активируемых калиевых каналов, тогда как для СГМК, предсокращенных ФЭ, - АТФ-чувствительных калиевых каналов плазмалеммы.

В самом деле, известно, что ТЭА в миллимолярных концентрациях примерно в равной степени блокирует VK_{Ca} , IK_{Ca} [71, 108] и SK_{Ca} [183], а также потенциал-зависимые K^+ каналы [103]. Наши эксперименты с избирательным блокированием харибдотоксином VK_{Ca} -каналов не выявили участия этих каналов в механизмах релаксации сероводородом СГМК. Селективное блокирование потенциал-зависимых K^+ -каналов 4-АП также практически не влияло на индуцированную H_2S релаксацию сегментов аорты крысы. В соответствии с этим, полученные нами данные свидетельствуют в пользу заключения о том, что открывание Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов малой и промежуточной проводимости является ключевым механизмом реализации расслабляющего действия сероводорода на ГМК аорты крысы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса.

Выводы

1. Сероводород оказывает разнонаправленное действие на сокращения сосудистых гладкомышечных клеток, индуцированные деполяризацией мембраны: констрикторное - в малых, и релаксирующее - при действии высоких концентраций.
2. Сероводород дозозависимо расслабляет гладкие мышцы аорты, предсокращенные стимуляцией фенилэфрином α_1 - адренорецепторов.
3. Ключевую роль в реализации констрикторного действия низких концентраций сероводорода на сосудистые сегменты, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса, играет активация Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспорта.
4. Релаксирующее действие сероводорода на предсокращенные в гиперкалиевом растворе Кребса сосудистые гладкие мышцы обусловлено открыванием кальций-активируемых калиевых каналов малой и промежуточной проводимости.
5. В сосудистых гладких мышцах, предсокращенных активацией α_1 -адренэргических рецепторов, релаксация, индуцированная сероводородом, связана с открыванием АТФ-чувствительных калиевых каналов мембраны.

Список литературы

1. Антипенко А.Е. Вторичные посредники в клетках сердца и гладких мышц сосудов / А.Е. Антипенко // Биохимия. – 1991. – Т. 56, вып. 4. – С. 589-620.
2. Анфиногенова Я.Д. Роль ионного транспорта, сопряженного с изменениями клеточного объема, в механизмах регуляции сократительной функции сосудистых гладкомышечных клеток / Я.Д. Анфиногенова: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук. – Томск, 2005. – 267с.
3. Баскаков М. Б. Механизмы регуляции функций гладких мышц вторичными посредниками / М. Б. Баскаков, М. А. Медведев, И. В. Ковалев, Л.В. Капилевич, Д.В. Загулова – Томск, 1996. – 154с.
4. Баскаков М.Б. Кальмодулин в механизмах регуляции сократительной функции гладкой мускулатуры / М.Б. Баскаков, М. А. Медведев // Бюлл. СО АМН СССР. – 1984. – N4. – С. 83-88.
5. Баскаков М.Б. Механизмы регуляции вторичными посредниками электрической и сократительной активности гладких мышц / М.Б. Баскаков: Дисс. д.м.н. – Томск, 1988. – 367с.
6. Баскаков М.Б. Роль протеинкиназы С в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц: эффект форболового эфира / М.Б. Баскаков, В.Б Студницкий, М.А. Медведев, Б.И. Ходоров // Бюлл. эксперим. биол. мед.- 1987.- N7.-С.8-11.
7. Бурый В.А. Роль внутриклеточного кальция в активации сокращения гладких мышц легочных артерий / В.А. Бурый, А.В. Гурковская, Н.И. Гокина, М.Ф. Шуба // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. – 1989. – Т. 105, N9. – С. 261-264.

8. Гусакова С.В. Роль цитоскелета в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток / С.В. Гусакова: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. – Томск, 2007. – 113с.
9. Гурковская А.В. О природе электромеханической связи в гладкомышечных клетках легочной артерии. /А.В.Гурковская, М.Ф.Шуба, В.А.Бурый //Физиол. Журнал СССР им И.М. Сеченова.-1983.-Т 69, №8.-С.1065-1073.
10. Гусев Н.Б. Внутриклеточные Са-связывающие белки / Н. Б. Гусев // Соросовский Образовательный Журнал. - 1998. - 5. - С. 2–16.
11. Гусев Н.Б. Молекулярные механизмы мышечного сокращения / Н. Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. – 2000. - 6 (8). – С. 24-32.
12. Камкин А. Г. Физиология и молекулярная биология мембран клеток: учеб. Пособие для студ. Высш. Мед. учеб. Заведений / А. Г. Камкин, И.С. Киселева. – М.: Издательский центр «Академия». – 2008. – 592с.
13. Ковалев И.В. Исследование механизмов NO-зависимого расслабления гладких мышц аорты крысы с помощью нитросоединений / И.В. Ковалев, А.Г. Попов, А.А. Панов и др. // Эксп. и клин. фармакол. – 2001. – 64. – С. 33-36.
14. Ковалев И.В. Роль оксида азота в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц / И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков, Л.В. Капилевич // Бюллетень сибирской медицины. – 2004. – 1. – С. 7-26.
15. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах / С.А. Костерин.- Киев: Наукова думка. – 1990. – 216с.
16. Кочемасова Н.Г. Роль ионов кальция в формировании плато потенциала действия гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки в безнатриевых растворах / Н. Г. Кочемасова // Физиол. ж. – 1982. – Т. 28, N2. – С. 206-214.

17. Курский М.Д., Транспорт кальция и функции гладких мышц / М.Д. Курский, Е.Т. Михайленко, А.Н. Федоров. – Киев : Наукова думка. – 1981. – 127с.
18. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин – М.: Высшая школа, 1980. – 296 с.
19. Левицкий Д. И. Применение метода дифференциальной сканирующей калориметрии для структурно-функциональных исследований мышечных белков / Д.И. Левицкий // Успехи биологической химии. – 2004. – 44. – С.133-170.
20. Лисенков А.Н. Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов / А.Н. Лисенков. - М.: Медицина. – 1979. - 344с.
21. Марри Г. Биохимия человека: в 2-х томах / Г. Марри, Д. Гренер, П. Мейес и др. - М.: Мир. -1993. – Т1. – 384с.
22. Марри Г., Гренер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: в 2-х томах / Г. Марри, Д. Гренер, П. Мейес и др. - М.: Мир. - 1993. – Т2. – 483с.
23. Мясоедова О. А. Роль сероводорода в реализации физиологических функций организма / О. А. Мясоедова, В. И. Коржов // Журн. НАМН України. – 2011. – Т.17. – С.191-200.
24. Николс Д. Д. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию: Пер. с англ. – М: Мир, 1985. – 190с.
25. Орлов С.Н. Кальмодулин / С.Н. Орлов. – М.: Итоги науки и техники. - 1987. - 209 с.
26. Половко А.М. Интерполяция. Методы и компьютерные технологии их реализации / А. М. Половко, П. Н. Бутусов – СПб.: БХВ – Петербург. – 2004. – 320с.
27. Расмуссен Г. Циркуляция кальция и внутриклеточная передача сигнала / Г. Расмуссен. - В мире науки. - 1989.-N12.-С.36-43.

28. Резник Н. Л. Третий газ / Н. Л. Резник // Химия и жизнь. – 2009. – 10. - С.40-46.
29. Рубцов А.М. Роль саркоплазматического ретикулула в регуляции сократительной активности мышц / А. М. Рубцов // Соросовский образовательный журнал. – 2000. –Т.6, №9. – С.17-24.
30. Сергеев П. В. Рецепторы физиологически активных веществ / П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский. - М.: Медицина. - 1987. -400с.
31. Ситдикова Г.Ф. Сероводород: от канализации Парижа к сигнальной молекуле / Г. Ф. Ситдикова, А. Л. Зефирова // Природа. – 2010. – 9. – С.29-38.
32. Скок В.И. Нервно-мышечная физиология / В.И. Скок, М.Ф. Шуба. – Киев: Вища школа. – 1986. – 224 с.
33. Тепперман Дж. Физиология обмена веществ и эндокринной системы / Дж. Тепперман, Х. Тепперман : Пер. с англ. – М. : Мир. – 1989. – 656с.
34. Ткачук В.А. Гормональная регуляция транспорта Ca^{2+} в клетках крови и сосудов / В.А. Ткачук // Российский Физиол. ж. им. И.М.Сеченова. – 1998. – Т.84, N10. – С. 1006-1018.
35. Ткачук В.А. Регуляция кальцием аденилатциклазной системы сердца / В.А. Ткачук // Кальций - регулятор метаболизма. – Томск. – 1987. – С. 25-37.
36. Тугай В.А. Механизмы поступления Ca^{2+} в цитоплазму мышечных клеток. Роль протонов и активных метаболитов азота (кислорода) в этих процессах / В. А. Тугай, Ю. В. Данилович // Укр. біохім. журн. – 2006. -Т. 78, № 2. – С. 37-51.
37. Уильямс Б. Методы практической биохимии / Б. Уильямс, К. Уилсон. – М: Мир. – 1978. – 273с.
38. Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. - М.: Наука. – 2004.

39. Ширинский В.П. Клеточная подвижность в сердечно-сосудистой системе / В.П. Ширинский, А.В. Воротников // Природа. – №12. – 2005. – С. 39-44.
40. Шуба М. Ф. Физиология сосудистых гладких мышц / М.Ф. Шуба, Н.Г. Кочемасова. - Киев: Наукова думка. - 1988.- 250с.
41. Шуба М.Ф. Мембранные механизмы возбуждения гладкомышечных клеток / М.Ф. Шуба, В.А Бурый // Физиол. ж. – 1984. – Т.30, N5. – С. 545-559.
42. Шуба М.Ф. Механизмы возбуждения и сокращения гладких мышц мозговых сосудов / М.Ф. Шуба, Н.И. Гокина. - Киев: Наукова думка. - 1991. – 129 с.
43. Шуба М.Ф. Пути и механизмы трансмембранного входа в гладкомышечные клетки ионов кальция, участвующих в активации сокращения / М.Ф. Шуба // Физиологический журнал. – 1981. – Т.27, N4. – С. 533-541.
44. Abe K. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator / K. Abe, H. Kimura // J. Neurosci. – 1996. – 16. – P. 1066-1071.
45. Abracham M. R. Channelopathies of inwardly rectifying potassium channels / M. R. Abracham, A. Jahangir, A. E. Alekseev, A. Terzici // The FASEB Journal. -1999. – 13. – P.1901-1910.
46. Akar F. Vasoconstrictors and nitrovasodilators reciprocally regulate the Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter in rat aorta / F. Akar, E. Skinner, J.D. Klein et al. // Am J Physiol. – 1999. – 276. – P. 1383 – 1390.
47. Akimova O. A. Transient activation and delayed inhibition of Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransport in ATP-treated C11-MDCK cells involve distinct P2Y receptor subtypes and signaling mechanisms / O. A. Akimova, A. Grygorczuk, R. A. Bunday et al / J. Biol. Chem. – 2006. – V. 281(42). – P.31317 – 31325.
48. Alekseev A. E. Ligand- insensitive state of cardiac ATP-sensitive K^+ channels. Basis for channel opening / A. E. Alekseev, P. A. Brady, A. Terzic // J. Gen. Physiol. – 1998. – 111. – P.381–394.

49. Ali M. Y. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo: a new role for endogenous hydrogen sulfide / M. Y. Ali, C. Y. Ping, Y. Y. Mok, L. Ling, M. Whiteman, M. Bhatia, P.K. Moore // *Br. J. Pharmacol.* – 2006. – 149. – P. 625-634.
50. Anfinogenova Y.J. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransport, intracellular Cl^- and L-type Ca^{2+} channels / Y.J. Anfinogenova, M.B. Baskakov, I.V. Kovalev et al. // *Pflügers Archiv.* – 2004. – 449. – P.42 – 55.
51. Barman S. A. CAMP activates BK_{Ca} channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase / S. A. Barman, S. Zhu, G. Han, R. E. White // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2003. – 284. – P.L1004-L1011.
52. Barnes P.J. Beta-adrenoreceptors smooth muscle, nerves cells / P. J.Barnes // *Life sci.* – 1993. – V.52, N26. – P. 2101- 2109.
53. Baskar R. Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role / R. Baskar, J. Bian // *European journal of pharmacology.* – 2011. – 656. – P.5-9.
54. Beauchamp R. O. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity / R. O. Beauchamp, J. S. Bus, J. A. Popp et al. // *Crit. Rev. Toxicol.* – 1984. – 13. – P. 25-97.
55. Belardinelli M. C. Urinary sulfur compounds in Down syndrome / M. C. Belardinelli, A. Chabli, B. Chadefaux - Vekemans, P. Kamoun // *Clin. Chem.* – 2001. – 47. - P.1500-1501.
56. Bellian J. Contribution of endo-thelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans / J. Bellian, C. Thuillez, R. Joannides // *Fundam. Clin. Pharmacol.* - 2008. - V. 22. - P.363—377.
57. Benavides G. A. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic / G. A. Benavides, G. L. Squadrito, R. W. Mills et al. // *Proceed. Nat. Academ. Sci. USA.* – 2007. – 104. – P. 17977-17982.
58. Berridge M. Receptors and on calcium signaling / M. Berridge // *Tends. Pharmacol. Sci.* – 1984. – V.2101. – P. 345-360.

59. Berridge M.J. Inositol triphosphate and DAG as second messenger / M.J. Berridge // *Biochem.J.* - 1984. - V.210. - P.345-360.
60. Brenneman K. A. Olfactory mucosal necrosis in male CD rats following acute inhalation exposure to hydrogen sulfide: reversibility and the possible role of regional metabolism / K. A. Brenneman, D. F. Meleason, M. Sar [et al.] // *Toxicol. Pathol.* – 2002. – 30. – P. 200-208.
61. Broillet M. C. S-nitrosylation of proteins / M. C. Broillet // *Cell. Mol. Life Sci.* - 1999. – 55. – P. 1036-1042.
62. Brown A. M. Functional bases for interpreting amino acid sequences of voltage-dependent K⁺ channels / A. M. Brown // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* - 1993. – 22. – P.173-198.
63. Brown R.A. Increased Na⁺K⁺Cl⁻ cotransport in rat arterial smooth muscle in deoxycorticosterone (DOCA)/salt-induced hypertension / R.A. Brown, A.R. Chipperfield, J.P. Davis et al. // *J Vasc Res.* – 1999. – 36. – P.492-501.
64. Bucci M. Hydrogen Sulfide Is an Endogenous Inhibitor of Phosphodiesterase Activity / M. Bucci, A. Papapetropoulos, V. Vellecco et al // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2010. – 30. – P.1998-2004.
65. Cheang W. S. 4-Aminopyridine-sensitive K⁺ channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery / W. S. Cheang, W. T. Wong , B. Shen et al // *Vascular Pharmacology.* – 2010. - 53. – P.94–98.
66. Chik C. L. PACAP modulates L-type Ca²⁺ channel currents in vascular smooth muscle cells: involvement of PKC and PKA / C. L. Chik, B. LI et al. // *FASEBJ.* – 1996. – 10. – P.1310-1317.
67. Chung S. Modulation of the inactivation of voltage-dependent potassium channels by cAMP / S. Chung, L. K. Kaczmarek // *The journal of neuroscience.* – 1995. – 15(5). – P.3927-3935.

68. Clark J.F. The creatine Kinase system in smooth muscle / J.F. Clark // *Molecular and Cellular Biochemistry*. - 1994. - 133. - P.221-232.
69. Collman J. P. Using a functional enzyme model to understand the chemistry behind hydrogen sulfide induced hibernation / J. P. Collman, S. Ghosh, A. Dey, R. A. Decréau // *PNAS*. – 2009. – V.106 (52). – P.22090-22095.
70. Cooper C. E. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance / C. E. Cooper, G. C. Brown // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2008. – 40. – P.533-539.
71. Davis J.P.L. Accumulation of intracellular chloride by (Na⁺-K⁺-Cl⁻) cotransport in rat arterial smooth muscle is enhanced in deoxycorticosterone acetate(DOCA)/salt hypertension / J.P.L. Davis, A.R. Chipperfield, A.A. Harper // *J Mol Cell Cardiol.* – 1993. – 25. – P.233 – 237.
72. De Alfonso R. A Ca²⁺/CaM protein kinase associated with Ca²⁺ transport in sarco(endo)plasmic vesicles from tracheal smooth muscle / R.De Alfonso, I.De Becemberg, M. Alfonso // *Life Sci.* – 1996. – V.58, N17. – P. 1403-1412.
73. Deiffenstein R. J. Toxicology of hydrogen sulfide / R. J. Deiffenstein, W. C. Hulbert, S. H. Roth // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1992. – 32. – P. 109-134.
74. Delpire E. Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells / E. Delpire, M. Rauchman, D. Beir et al. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – 269. – P.25677–25683.
75. Dhaese I. Mechanisms of action of hydrogen sulfide in relaxation of mouse distal colonic smooth muscle / I. Dhaese, I. V. Colen, R. A. Lefebvre // *European journal of pharmacology*. – 2010. – 628. – P.179-186.
76. Di Villa Bianca R. d'E. Hydrogen sulphide induced-dual vascular effect involves arachidonic acid cascade in rat mesenteric arterial bed / R. d'E. di Villa

Bianca, R. Sorrentino, C. Coletta et al // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2011. – 337 (1). – P.59-64.

77. Dombkowski R. A. Hydrogen sulfide mediates hypoxia-induced relaxation of trout urinary bladder smooth muscle / R. A. Dombkowski, M. M. Doellman, S. K. Head, K. R. Olson // *The journal of experimental biology.* – 2006. – 209. – P.3234-3240.

78. Dombkowski R.A., B.A Effects of hydrogen sulfide in vertebrate smooth muscle / R.A. Dombkowski, B.A.: A Dissertation for the degree of doctor of philosophy - Notre Dame, 2006. – 268p.

79. Dorman D. C. Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correction with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung and nasal epithelium / D. C. Dorman, F. J. Moulin, B. E. Mc Manus, K. C. Mahle, R. A. James, M. F. Struve // *Toxicol. Sci.* – 2002. – 65. – P. 18-25.

80. Dzeja P. P. Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K1 channels / P. P. Dzeja, A. Terzic // *FASEB J.* – 1998. – 12. – P.523–529.

81. Ebrahimkham M. R. Hydrogen sulfide and the hyperdynamic circulation in cirrhosis: a hypothesis / M. R. Ebrahimkham, A. R. Mani, K. Moore // *Gut.* – 2005. – 54(12). – P. 1668-1671.

82. Elsey D. J. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S) / D. J. Elsey, R. C. Fowkes, G. F. Baxter // *Cell Biochem Funct.* – 2010. – 28. – P.95-106.

83. Feletou M. EDHF: an update / M. Feletou, P. M. Vanhoutte // *Clinical Science.* – 2009. – 117. – P.139–155.

84. Furne J. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values / J. Furne, A. Saeed, M. D. Levitt // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2008. – 295. – P.R1479-R1485.

85. Gadsby D. C. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle / C. D. Gadsby // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2009. - 10(5). –P. 344–352.

86. Gauthier K.M. Apamin-sensitive K^+ currents mediate arachidonic acid-induced relaxations of rabbit aorta / K.M. Gauthier, N. Spitzbarth, E.M. Edwards et al // *Hypertension*. – 2004. – 43 (2). – P.413-419.
87. Glukhova M.A. Phenotypic changes of human aortic smooth muscle cells during development and in adult. M.A. Glukhova, M.G. Fri, V.E. Koteliansky / *J. Atheroscler. Thromb.* – 1994. - 1(1). – P. S47-S49.
88. Gnaiger E. Respiratory states and flux control ratios / E. Gnaiger // *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control*. – 2008. – P.43-50.
89. Guidotti T. L. Hydrogen sulfide / T. L. Guidotti // *Occup. Med.* – 1996. – 46. – P. 367-371.
90. Guidotti T. L. Hydrogen Sulfide: Advances in Understanding Human Toxicity / T. L. Guidotti // *International Journal of Toxicology*. – 2010. – 29. – P.569-581.
91. Guo W. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction / W. Guo, J.-tao Kan, Z.-yu Cheng et al. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. - 2012. - [Электронный ресурс] <http://www.hindawi.com/journals/oximed/2012/878052/>.
92. Gupta Y. K. Gaso-transmitter hydrogen sulfide: potential new target in pharmacotherapy / Y. K. Gupta, A. K. Dahiya, K. H. Reeta // *Indian journal of experimental biology*. – 2010. – 48. – P.1069-1077.
93. Gutterman D. D. Redox modulation of vascular tone: focus on potassium channel mechanisms of dilation / D. D. Gutterman, H. Miura, Y. Liu // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2005. – 25. – P.671-678.
94. Hamilton C. Calmodulin and excitation-contraction coupling / C. Hamilton, I. Serysheva, G. Strasburg // *News Physiol. Sci.* – 2000. – V.15, N.12. – P. 201-204.

95. Hamilton K. L. cAMP-induced potassium channel activity in apical membrane of cultured A6 kidney cells / K. L. Hamilton, D. C. Eaton // *AJP – Renal Physiol.* – 1991. – V.261. - №6. – P.F1055-F1062.

96. Heinzinger H. In rat hepatocytes, the hypertonic activation of Na(+) conductance and Na(+)-K(+)-2Cl(-) symport but not Na(+)-H(+) antiport – is mediated by protein kinase C / H. Heinzinger, F. van den Boom, H. Tinel et al // *J. Physiol.* – 2001. – V.536 (pt3). – P.703-715.

97. Hille B. Ionic channels of excitable membrane, 2nd ed. / B. Hille, - Massachusetts: Sinauer associates, Inc. – 1992. – 607p.

98. Hoffman E.K. Sensors and signal transduction pathways in vertebrate cell volume regulation / E.K. Hoffman, S.F. Pedersen // Lang F. (ed): *Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation: - Contrib.Nephrol.* Basel. Karger. – 2006. – V.152. – P.54-104.

99. Hosoki R. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide / R. Hosoki, N. Matsuki, H. Kimura // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. – 237. – P. 527-531.

100. Huang C.Y. Mechanisms activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase / C.Y. Huang, V. Chan, P.B. Chock et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1981. - Vol.78. - P. 871 – 874

101. Hughes S. Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina in vivo / Hughes S, Chan-Ling T. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2004. – 45 (8). – P. 2795-2806.

102. Ignarro L. Endothelium-derived relaxing factor produced and secreted from artery and vein is nitric oxide / L. Ignarro, G. Buga, K. Wood, et.all. // *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* – 1987. – V.84. – P. 9265-9269.

103. Ikeda S.R. Influence of permeating ions on potassium channels block by external tetraethylammonium / S.R. Ikeda, Korn S.J. // *Journal of Physiology.* – 1995. – 486 (2). – P.267-272.

104. Ishida Y. Compartmentation of ATP synthesis and utilization in smooth muscle: roles of aerobic glycolysis and creatine kinase / Y. Ishida, T. Wallimann, R.J. Paul // *Molecular and Cellular Biochemistry* Riesinger. – 1994. – 133. - p.39-50.

105. Ishii T. M. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channels / T. M. Ishii, C. Silvia, B. Hirschberg et al // *PNAS*. – 1997. – 94. – P.11651-11656.

106. Isomoto S. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K1 channel / S. Isomoto, C. Kondo, M. Yamada et al / *J. Biol. Chem.* – 1996. – 271. – P.24321–24324.

107. Itoh T. Differences and similarities in the noradrenaline- and caffeine-induced mechanical responses in the rabbit mesenteric artery / T. Itoh, H. Kuriyama, H. Suzuki // *J. Physiol.* – 1983. – 337. – P. 609-629.

108. Jang G. Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells / G. Jang, L. Wu, W. Liang, R. Wang // *Mol. Pharmacol.* – 2005. – 68. – P. 1757-1764.

109. Jha S. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling / S. Jha, J.W. Calvert, M.R. Duranski et al. // *America Journal of Physiology.* - 2008. - 295(2). - P. H801-H806.

110. Jia X. The global transcriptional response of fission yeast to hydrogen sulfide / X. Jia, W. He, A. I. H. Murchie, D. Chen // *PlosOne*. – 2011. – V.6 (12). – P.e28275.

111. Jiang G. Aldosterone regulates the Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter in vascular smooth muscle / G.Jiang, S. Cobbs, J.D. Klein et al. // *Hypertension*. – 2003. – 41. – P. 1131 – 1135.

112. Kabil O. Redox biochemistry of hydrogen sulfide / O. Kabil, R. Banerjee // *The Journal of biological chemistry*. – 2010. – 29. – P.21903-21907.

113. Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals / P. Kamoun // *Amino Acids*. – 2004. – 26. – P. 243-254.

114. Kaneko Y. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic β -cells (possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter) / Y. Kaneko, Y. Kimura, H. Kimura, I. Niki // *Diabetes*. – 2006. – 55(5). – P. 1391-1397.
115. Kapoport R. M. Effect of cyanide on nitrovasodilator-induced relaxation, cyclic GMP accumulation and guanylate cyclase activation in rat aorta / R. M. Kapoport, F. Murad // *Eur. J. Pharmacol.* – 1984. – 104. – P. 61-70.
116. Karaki H. Calcium release in smooth muscle / H. Karaki, B. Weiss // *Life sci.*-1988,-V.42, N2.-P.111-122.
117. Kaue A. D. Influence of PLC and MCK inhibitors and the role of L-calcium channels in the cat pulmonare vascular beg. /D. Kaue Alan, D.Nossaman Bobby // *Amer. J. Physiol.*-1995.-269.-P.507-513
118. Kaunitz J.D. NKCC₁: tales from the dark side of crypt / J. D. Kaunitz // *The Journal of Physiology*. – 2007. – V. 582.2. – P.477.
119. Kawano Y. Smooth muscle contraction by small GTPase Rho / Y. Kawano, T. Yoshimura, K. Kaibuchi // *Nagoya J. Med Sci.* – 2002. – 65(1-2). – P.1-8.
120. Khan A. A. Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats / A. A. Khan, M. M. Schuler, M. G. Prior et al. // *Toxicol. Appl. Pharm.* – 1990. – 103(3). – P. 482-490.
121. Kim J.A. Activation of Na(+), K(+), Cl(-) – cotransport mediates intracellular Ca(2+) increase and apoptosis induced by Pinacidil in HepoG2 human hepatoblastoma cells / J. A. Kim, Y. Y. Kang, Y. S. Lee // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2001. – V. 281(2). – P. 511-519.
122. Kiss L. Hydrogen sulfide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition / L. Kiss, E. A. Deitch., C. Szabo // *Life sciences*. – 2008. – 83. - P.589-594.

123. Koenitzer J. R. Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O₂-dependent manner / J. R. Koenitzer, T. S. Isbell, H. D. Patel et al // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2007. – 292. – P.H1953–H1960.
124. Koltsova S.V. Excitation-contraction coupling in resistant mesenteric arteries: evidence for NKCC1-mediated pathway / S.V. Koltsova, S.V. Kotelevtsev, J. Tremblay // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2009. – 379. – P.1080 – 1083.
125. Koltsova S.V. Myogenic tone in mouse mesenteric arteries: evidence for P2Y receptor-mediated, Na⁺, K⁺, 2Cl⁻-cotransport-dependent signaling / S.V. Koltsova, G.V. Maximov, S.V. Kotelevtsev // *Purinergic Signal.* – 2009. – 5. – P.343 – 349.
126. Kondrasheva M.N. Mechanism of physiological activity and cure affect of small doses of succinic (amber) acid. // *Europ. J. Medical Res.* - 2000. - V. 5. №1. - P. 58-68.
127. Kovalev I.V. Effect of Na⁺,K⁺,2C⁻- cotransport inhibitor bumetanide on electrical and contractile activity of smooth muscle cells in guinea pig ureter / I.V. Kovalev, M.B. Baskakov, Y.J. Anfinogenova, Y.L. Borodin et al. // *Bull.Exp.Biol.Med.* – 2003. - 136(8). – P.145-149.
128. Kubo S. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension / S. Kubo, I. Doc, Y. Kurokawa, H. Nishikawa, A. Kawadata // *Toxicology.* – 2007. – 232. – P.132-146.
129. Kukovetz W. R. Cyclic nucleotides and relaxation of vascular smooth muscle in vasodilation / C. Poch, S. Holtzmann // *Vasodilation.* – 1981. – P.339-353.
130. Kuriyama H. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels / H. Kuriyama, K. Kitamura, T. Itoh, R. Inoue // *Physiol. Rev.* – 1998. – V. 78, No.3 – P. 811-920.
131. Lavu M. Hydrogen sulfide - mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic protection / M. Lavu, S. Bhushan, D.J. Lefler // *Clinical Science.* - 2011. - 120(6). - P. 219-229.

132. Ledoux J. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone / J. Ledoux, M. E. Werner, J. E. Brayden, M. T. Nelson // *Physiology*. – 2006. – 27. – P.69-79.
133. Lee S.W. Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial Cells // S. W. Lee, Y. S. Hu, L.F. Hu et al // *Glia*. – 2006. – 54. – P.116–124.
134. Lee S.W. Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells / S. W. Lee, Y. Cheng, P. K. Moore, J.-S. Bian // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2007. – 358 (4). – P.1142-1147.
135. Leffler C.W. Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation / C.W. Leffler, H. Parfenova, J.H. Jaggar et al. // *Physiol*. – 2006. - 100(3). – P.1065-1076.
136. Leffler C.W. Hydrogen sulfide and cerebral microvascular tone in newborn pigs / C.W. Leffler, H. Parfenova, S. Basuroy et al. // *J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2011. - 300(2). - H440-447.
137. Li H. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. H. Li, U. Förstermann // *J Pathol*. – 2000. - 190(3). – P.244-54.
138. Li L. Hydrogen sulfide and cell signaling / L. Li, P. Rose, P. K. Moore // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. – 2011. – 51. – P.169-187.
139. Li X. Amino acids and gaseous signaling / X. Li, F.W. Bazer, H. Gao et al. // *Amino Acids*. – 2009. - 37(1). – P.65-78.
140. Liang G. H. Hydrogen sulfide dilates cerebral arterioles by activating smooth muscle cell plasma membrane KATP channels / G. H. Liang, A. Adebisi, M. D. Leo, E. M. McNally, C. W. Leffler, J. H. Jaggar // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2011. - 300(6). – H.2088-2095.
141. Liedtke C.M. Bumetanide-sensitive Na(+), K(+), Cl(-) – cotransport in bovine tracheal epithelial cells / C. M. Liedtke // *Am. J. Physiol*. – 1992. – V.262. – P. L621-L627.

142. Lim J. J. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells / J. J. Lim, Y. - H. Liu, E. S. Win Khin, J. - S. Bian // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2008. – 295. – P. 1261-1270.
143. Liu Y.H. Hydrogen sulfide and renal ischemia / Y.H. Liu, M. Lu, J.S. Bian // *Expert Rev Clin Pharmacol.* - 2011. - 4(1). – P.49-61.
144. Lowicka E. Hydrogen sulfide – the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // *Pharmacol. Reports.* - 2007. - 59. - P. 4-24.
145. Luksha L. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease / L. Luksha, S. Agewall, K. Kublickiene // *Atherosclerosis.* - 2009. - V. 202.- P. 330—344.
146. Ma J. Junctional membrane structure and store operated calcium entry in muscle cells / J. Ma, Z. Pan // *Front Biosci.* – 2003. – 8. – P. 242-55.
147. MacKenzie C.J. Regulation of glucose transport in aortic smooth muscle cells by cAMP and cGMP / J. C. MacKenzie, J. M. Wakefield et al. / *Biochem. J.* – 2001. – 353. – P. 513-519.
148. Mancardi D. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: hydrogen sulfide / D. Mancardi, C. Penna, A. Merlino et al. // *Biochim Biophys Acta.* – 2009. - 1787(7). – P.864-872.
149. Marshall W.S. The role of volume-sensitive ion transport systems in regulation of epithelial transport / W.S. Marshall, C.G. Oosum, E.K. Hoffmann // *Comparative Biochemistry and Physiology.* – 2007. – 148.- P. 29–43.
150. Mathaia J. C. No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide / J. C. Mathaia, A. Missnerb, P. Ku et al // *PNAS.* – 2009. – 106 (39). – P.16633–16638.
151. Matsumoto T. Phosphodiesterases in the vascular system / T. Matsumoto, T. Kabayashi, K. Kamata // *J. Smooth Muscle Res.* – 2003. – 39. – P. 67-86.
152. Mayevskiy A. Oxidation-reduction states of NADH in vivo: from animals to clinical use / A. Mayevskiy, B. Chance // *Mitochondrion.* – 2007. – V.7. – P.330-339.

153. McManus O.B. Calcium-activated potassium channels. Regulation by calcium / O. B. McManus // *Journal of bioenergetics and biomembranes*. – 1991. – 23(4). – P.537-560.

154. Menkes H. Protein kinase C regulation smooth muscle tension in guinea-pig trachea and ileum / H. Menkes, J.M. Baraban, S.H. Snyder // *Europ.J. Pharmacol.*-1986.-V.122.- P.19-27.

155. Meyer J.W. Decreased blood pressure and vascular smooth muscle tone in mice lacking basolateral $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter / J.W. Meyer, M. Flagella, R.L. Sutliff // *Am J Physiol*. – 2002. -283. – P.H1846 – H1855.

156. Murphy R.A. The role of myosin light chain phosphorylation in regulation of the cross bridge cycle / R.A. Murphy, M.O. Aksoy, P.F. Dillon et al. // *Fed. Proc.* – 1983. – 42. – P.51-56.

157. Mustafa A. K. H₂S signals through protein S-sulfhydration / A.K. Mustafa, M.M. Gadalla, N. Sen // *Sci. Signal.* - 2009. - V. 2. – P.72.

158. Muzaffar S. Exogenous hydrogen sulfide inhibits superoxide formation, NOX-1 expression and Rac, activity in human vascular smooth muscle cells / S. Muzaffar, N. Shukla, M. Bond, A. G. Newby et al // *Journal of Vascular Research*. – 2008. – 45. – P. 521-528.

159. Muzaffar S. Hydrogen sulfide inhibits superoxide formation and NADPH oxidase expression in endothelial cells: mediation by the cyclic AMP protein kinase A pathway / S. Muzaffar, J. Y. Jeremy // *Gordon conference on NADPH oxidase*. – 2006.

160. Naito Y. Differences in responses to norepinephrine and adenosine triphosphate in isolated, perfused mesenteric vascular beds between normotensive and spontaneously hypertensive rats / Y. Naito, H. Yoshida, C. Konishi, N. Ohara // *J. Cardiovasc.Pharmacol.* –1998.-V.32,N5.-P. 807-818.

161. Nakano A. The three-dimensional structure of vascular smooth muscle cells: a confocal laser microscopic study of rabbit mesenteric arterioles / A. Nakano, M. Minamiyamab, J. Seki // *Asian Biomedicine*. – 1(1). – 2007. – P.77-86.

162. Nelson M. Quayle Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle / M. Nelson // *Am. J. Physiol.* – 1995. – V.268. – P. 799-822.
163. Nicholson C.K. Hydrogen sulfide and ischemia/reperfusion injury / C.K. Nicholson, J.W. Calvert // *Pharmacological Research.* - 2010. - 62(4). - P.289-297.
164. O'Neill W. C. Functional coupling of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport and Ca^{2+} -dependent K^+ channels in vascular endothelial cells / W. C. O'Neill, J. F. Steinberg // *Am. J. Physiol.* – 1995. – V.267. – P.C267-C274.
165. O'Donnel M. Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle / M. O'Donnel, N. Owen // *Physiol. Rev.* – 1994. – V.74, N3. – P. 683-721
166. Orlov S.N. Bumetanide-sensitive ion fluxes in vascular smooth muscle cells: lack of functional $\text{Na}^+\text{,K}^+\text{,2Cl}^-$ cotransport / S.N. Orlov, J. Tremblay, P. Hamet // *J. Membrane Biol.* – 1996. – 153. – P. 125-135.
167. Orlov S.N. Ca-activated K channels of erythrocytes: the study by means of the registration of Ca-induced alterations of membrane potential / S.N. Orlov, I.V.Petrova, M.B. Baskakov, M.A. Medvedev // *Biol Membr.* – 1992. – 9. – P. 885-903.
168. Orlov S.N. cAMP signaling inhibits dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} influx in vascular smooth muscle cells / S.N. Orlov, J. Tremblay, P. Hamet // *Hypertension.* – 1996. – V.27. – P. 774-780
169. Orlov S.N. $\text{Na}^+\text{, K}^+$ - pump and $\text{Na}^+\text{, K}^+$ - cotransport in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: baseline activity and regulation / S.N. Orlov, T.J. Resink, J. Bernhardt, F.R. Buhler // *J. Hypertens.* – 1992. – 10. – P.733 – 740.
170. Palacios J. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter is implicated in gender differences in the response of the rat aorta to phenylephrine / J. Palacios, F. Espinoza, C. Munita et al. // *Br J Pharmacol.* – 2006. – 148. - P964 –972.
171. Papapetropoulos A. Hydrogen sulfide is endogenous stimulator of angiogenesis / A. Papapetropoulos, A. Pyriochou, Z. Altaany et al. // *PNAS.* – 2009. – V.106 (5). – P.21972-21977.

172. Paton D.M. Effect of metabolic inhibitors on contraction of rabbits detrusor / D.M. Paton // *Br.J.Pharmac.* – 1968. - 34. – P.493-498.
173. Picton R. Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese / R. Picton, M. C. Eggo, G. A. Merrill // *Gut.* – 2002. – 50. – P. 201-205.
174. Quevillon-Cheruel S. Role of the C-terminal extremities of the smooth muscle myosin heavy chains: implication for assembly properties / S. Quevillon-Cheruel, G. Foucault, M. Desmadril, A-M. Lompre, et al. // *FEBS Letters.* - 1999. – 454. – P. 303-306.
175. Reiffenstein P. J. Toxicology of hydrogen sulfide / R. J. Reiffenstein, W. C. Hulbert, S. H. Roth // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1992. – 32. – P. 109-134.
176. Ren J. The actions of prostaglandin E2 on potassium currents in rat tail artery vascular smooth muscle cells: regulation by protein kinase A and protein kinase C / J. Ren, E. Karpinski, C. Benishin // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1996. – V277, N1. – P. 394-402.
177. Roberts E. S. Gene expression changes following acute hydrogen sulfide (H₂S)-induced nasal respiratory injury / E. S. Roberts, R. S. Thomas, D. C. Dorman // *Toxicologic Pathology.* – 2008. – 36(4). – P. 560-564.
178. Roth S. H. Hydrogen sulfide / In: *Handbook of Hazardous Materials* // S. H. Roth. – USA.: Academic Press. Inc., 1993. – P. 307-376.
179. Rovner A.S. A long, weakly charged actin-binding loop is required for phosphorylation dependent regulation of smooth muscle myosin / A.S. Rovner // *J. Biol. Chem.* – 1998. –273. – P. 939-944
180. Russel J. M. Sodium – Potassium – Chloride cotransport / J. M. Russel // *Physiol. Rev.* – 2000. – V.80. – P.211-276.
181. Saga H. Phenotype-dependent expression of alpha-smooth muscle actin in visceral smooth muscle cells / H. Saga, K. Kimura, K. Hayashi et all. // *Exp. Cell. Res.* – 1999. – V. 247 (1). – P. 279-292.

182. Searcy D. G. Sulfur reduction by human erythrocytes/ D. G. Searcy, S. H. Lee// *J.Exp. Zool.* – 1998. – 282. – P.310-322.
183. Sheng J.Z. Small- and intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels directly control agonist-evoked nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells / J.Z. Sheng, A.P. Braun // *Am J Physiol Cell Physiol* July. – 2007. - 293. – P.1C458-C467.
184. Shibuya N. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide / N. Shibuya, Y. Milkanai, Y. Kimura, N. Nagahara, H. Kimura // *Journal of Biochemistry Advance Access.* – 2009. – 146. – P.623-626.
185. Shin J.-H. Purinergic stimulation induces Ca^{2+} -dependent activation of Na^{+} - K^{+} - 2Cl^{-} cotransporter in human nasal epithelia / J.-H. Shin, W. Namkung, J. Y. Choi et al // *Journal of Biological Chemistry.* – 2004. – V. 279. - № 18. – P.18567 – 18574.
186. Skovgaard N. The Role of Endogenous H_2S in Cardiovascular Physiology / N. Skovgaard, A. Gouliaev, M. Aalling, U. Simonsen // *Curr Pharm Biotechnol.* – 2011. – V.12. – P.1385-1393.
187. Small C. The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell / C. Small, H. Gimona // *Acta Physiologica Scandinavica.* – 1998. – V.164. – P. 341.
188. Stamler T. S. (S)NO signals: translocation, regulation and a consensus motif / T. S. Stamler, E. J. Toone, S. A. Lipton, N. J. Sucher // *Neuron.* – 1997. – 18. – P. 691-696.
189. Stipanuk M. H. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphydration in liver and kidney of the rat / M. H. Stipanuk, P. W. Beck // *Biochem. J.* – 1982. – 206. – P. 267-277.
190. Suematsu M. Quartet signal transducers in gas biology / M. Suematsu // *Antioxid Redox Signal.* – 2003. - 5(4). - 435-437.
191. Sun W.H. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under

ischemia/reperfusion / W.H. Sun, F. Liu, Y. Chen et al. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2012. - 421(2). - P.164-169.

192. Szabo C. Hydrogen sulfide and its therapeutic potential / C. Szabo // *Nature Reviews*. – 2007. – 6. – P. 917-935.

193. Tang G. Direct stimulation of K_{ATP} channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells / G. Tang, L. Wu, W. Liang, R. Wang // *Molecular pharmacology*. – 2005. – V.68 (6). – P.1757-1764.

194. Tani E. Continuous elevation of intracellular Ca^{2+} is essential for the development of cerebral vasospasm / E. Tani, T. Matsumoto // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2004. – 2(1). – P.13-21.

195. Tian X.Y. NaHS relaxes rat cerebral artery in vitro via inhibition of l-type voltage-sensitive Ca^{2+} channel / X.Y. Tian, W.T. Wong, N. Sayed et al. // *Pharmacol Res.* – 2012. - 65(2). – P.239-46.

196. Toland H. Ca²⁺-activated Cl⁻ current in sheep lymphatic smooth muscle / H. Toland, K. Mc. Closkey, K. Thornbury et al. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2000. – V. 279. – P. C1327–C1335.

197. Valdez I. H. Microfluorometric studies of intracellular Ca^{2+} and Na^{+} concentrations in normal human labial gland acini / I. H. Valdiz, M. Paulais, et al // *Am. J. Physiol.* – 1994. – V. 267. – P.G601-G607.

198. Vignez M. Dual control of the intracellular pH in aortic smooth muscle cells by a cAMP-sensitive HCO_3^-/Cl^- antiporter and a protein kinase C - sensitive Na^+/H^+ antiporter / P. Vignez, J.-P. Breittmayerj, C. Frelinzll, M. Lazdunskiz // *The Journal of biological chemistry*. – 1988. - V. 263, N. 34. – P. 18023-18029.

199. Wagner C. A. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator / C. A. Wagner // *Journal of Nephrology*. – 2009. – 22(2). – P. 173-176.

200. Wang R. P-205: The endothelium-modulated but cyclic GMP-independent vasorelaxant effect of H₂S / R. Wang, W. Zhao, X. Sun // *Am. J. Hypertens.* – 2002. – 15. – P.103A–103A.
201. Wang R. Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulfide / R. Wang // *Curr Opin Nephrol Hypertens.* – 2011. - 20(2). – P. 107-112.
202. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? / R. Wang // *FASEB J.* – 2002. -16. – P. 1792-1798.
203. Wang Y. Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats / Y. Wang, P. Mainali, C.Tang et al // *Chin. Med. J.* - 2008. - 121(5). – P.420-423.
204. Warenycia M. W. Hydrogen sulfide in combination with taurine or cysteic acid reversibly abolishes sodium currents in neuroblastoma cells / M. W. Warenycia, J. A. Steele, E. Karpinski, R. J. Reiffenstein // *Neurotoxicology.* – 1989. – 10. – P. 191-199.
205. Webb G. D. Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery / G. D. Webb, L. H. Lim, V. M. S. Oh, S. B. Yeo, Y. P. Cheong, M. Y. Ali [et al.] // *JPET.* – 2008. – 324(2). – P. 876-882.
206. Webb J. G. Adenylyl cyclase isoforms and signal integration in models of vascular smooth muscle cells / J. G. Webb, P. W. Yates, Q. Yang, Y. V. Mukkin, S. M. Lanier // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – 281. - P. H1545-H1552.
207. Whiteman M. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide / M. Whiteman, L. Li, I. Kostetski, S. H. Chu, J. L. Siau, M. Bhatia, P. K. Moore // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – 343. – P. 303-310.
208. William F. J. Potassium Channels and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells / F. J. William // *Circ. Res.* – 2005. – 97. – P.1211-1212.

209. Wong M. M. Y. Oscillations of cytosolic sodium during calcium oscillations in exocrine acinar cells / M. M. Y. Wong, J. K. Foskett // *Science*. – 1991. – V.254. – P.1014-1016.
210. Xu J.C. Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter / J.C. Xu, C. Lytle, T. Zhu et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1994. – 91. – P.2201–2205.
211. Xu M. Electrophysiological effects of hydrogen sulfide on guinea pig papillary muscles in vitro / M. Xu, Y.-M.Wu, Q.Li et al // *Acta Physiologica Sinica*. – 2007. - 59 (2). – P.215-220.
212. Yamada M. Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K^+ channel / M.Yamada, S. Isomoto, S. Matsumoto et al // *J. Physiol.* – 1997. – 499. – P.715–720.
213. Yan H. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats / H. Yan, J. Du, C. Tang // *Biochem. Biophys. Res. Common.* – 2004. – 313. – P. 22-27.
214. Yang G. Cystathionine γ -lyase overexpression inhibits cell proliferation via a H_2S -dependent modulation of ERK $\frac{1}{2}$ phosphorylation and $\text{p}21^{\text{cip/WAK-1}}$ / G. Yang, K. Cao, L. Wu, R. Wang // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – 209(47). – P. 49199-49205.
215. Yang G. H_2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase / G. Yang, L. Wu, B. Jiang et al. // *Science*. - 2008. - V. 322.- P. 587—590.
216. Yang W. Activation of KATP channels by H_2S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms / W. Yang, G. Yang, X. Jia, L. Wu, R. Wang // *The Journal of Physiology*. – 2005. – 569. – P. 519-531.
217. Zhao P. Dual effect of exogenous hydrogen sulfide on the spontaneous contraction of gastric smooth muscle in guinea-pig / P. Zhao, X. Huang, Z.-x. Qiu [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2007. – 616. – P. 223-228.

218. Zhao W. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms / W. Zhao, R. Wang // *Am. J. Physiol. Heart. Circ Physiol.* – 2002. – 283. – P. 474–480.
219. Zhao W. Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues // W. Zhao, J. F. Ndisang, R. Wang // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2003. – 81. – P.848-853.
220. Zhao W. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang // *The EMBO Journal.* – 2001. – 20(21). – P. 6008-6016.
221. Zhi L. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U 937 via the ERK-NF-κB pathway / L. Zhi, A. D. Ang, H. Zhang, P. K. Moore, M. Bhatia // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – 81. – P. 1322-1332.
222. Zuidema M. Y. Antecedent hydrogen sulfide elicits an anti-inflammatory phenotype in postischemic murine small intestine: role of BK channels / M. Y. Zuidema, Y. Yang, M. Wang et al // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2010. – 299(5). – P.1554-1567.