

На правах рукописи

**ПОПОВ АЛЕКСАНДР ГЕННАДЬЕВИЧ**

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ НИТРОСОЕДИНЕНИЙ  
НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ И СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГЛАДКИХ  
МЫШЦ МОЧЕТОЧНИКА И TAENIA SOLI МОРСКОЙ СВИНКИ**

03.00.13 - физиология

03.00.02- биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**ТОМСК – 2004 г.**

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации»

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук,

профессор

**Баскаков Михаил Борисович**

доктор медицинских наук

**Ковалев Игорь Викторович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,

профессор

**Байков Александр Николаевич**

доктор биологических наук,

профессор

**Евдокимов Евгений Васильевич**

**Ведущая организация:**

**ГУ НИИ физиологии СО РАМН, г. Новосибирск**

Защита состоится " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2004 г. в \_\_\_\_ часов

на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского медицинского университета (г. Томск, проспект Ленина, 107).

Автореферат разослан " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2004 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

**Суханова Г. А.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Многочисленные первичные посредники реализуют свой эффект на гладкомышечные клетки (ГМК) через систему вторичных мессенджеров: ионы кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ), циклический аденозин- (цАМФ) и гуанозинмонофосфат (цГМФ), инозитолтрифосфат (ИТФ) и диацилглицерол (ДАГ) [Баскаков М.Б. с соав., 1988-2001; Ткачук В.А., 1998; Kuriyama H., e.a., 1998; Somlyo A.P., Somlyo A.V., 1994].

Хорошо известно, что расслабляющее влияние эндотелия сосудов и эпителия воздухоносных путей на ГМК опосредовано оксидом азота (NO) [Ignarro L., e.a., 1987; Furchgott R., Vanhoutte P., 1989; Luscher T., 1989; Moncada S., 1992]. От классических первичных посредников, регулирующих функции гладких мышц, NO отличается тем, что индуцирует внутриклеточные процессы без взаимодействия с рецепторами плазматической и внутриклеточных мембран. Проникая в ГМК, он увеличивает внутриклеточную концентрацию цГМФ, и цГМФ-зависимые протеинкиназы (ПК-G), стимулируют удаление наружу из клетки  $\text{Ca}^{2+}$  и/или его депонирование в саркоплазматический ретикулум [Lincoln T., e.a., 2001; O'Donnel M., 1994; Vaandrager A., 1996].

Вместе с тем, роль оксида азота не ограничивается только участием в процессах локальной регуляции гладких мышц. В последние годы было показано, что NO является нейро-трансммитером в некоторых центральных и периферических синапсах [Gorren A., Mayer B., 1997; Ito Y., 1998; Janssen L., e.a., 1999]. Нитрооксидэргическая иннервация присутствует в органах желудочно-кишечного тракта, мочевыводящей и репродуктивной системах, где ее стимуляция угнетает спонтанную активность ГМК тонкого кишечника, матки и др. [Поленов М.А., 1998; Denninger J., Marletta M., 1999; Shibata C., e.a., 1998; Vedernikov Y., e.a., 2000]. Эти данные позволяют рассматривать оксид азота в качестве первичного посредника, обеспечивающего не только локальную, но и дистантную регуляцию гладкомышечных органов.

В связи с выше указанным, большое значение имеют исследования механизмов влияния оксида азота на электрическую и сократительную активность ГМК различных органов. В настоящее время, подавляющее большинство работ выполняется на гладких мышцах сосудов и воздухоносных путей [Капилевич Л.В. с соав., 1995-2003; Ковалев И.В. с соав., 1997-2003; Vanhoutte P., 1989; Luscher T., 1989; Moncada S., 1992].

Большой прогресс в изучении NO-зависимых реакций был достигнут в связи с открытием способности некоторых нитросоединений воспроизводить эффекты оксида азота, обладающего высокой реакционной активностью, и, следовательно, небольшой продолжительностью действия, более продолжительными и хорошо управляемым способом [Реутов В.П., Орлов С.Н. 1993; Yamakage M., 1996].

Феноменология влияния нитросоединений, доноров NO, на сократительную функцию гладких мышц достаточно хорошо известна. Во всех исследованных типах мышц они вызывали уменьшение механического напряжения, угнетали, если таковая имелась, спонтанную активность и снижали величину сократительных ответов на действие физиологически (ФАВ) и биологически активных веществ (БАВ) [Капилевич Л.В. с соав., 1995-2004; Ковалев И.В. с соав., 1997-2004; Поленов М.А., 1998; Ignarro L., e.a., 1987; Furchgott R., Vanhoutte P., 1989; Moncada S., 1992].

Однако недавние исследования свидетельствуют о том, что кажущаяся простота межклеточных взаимодействий в стенке сосуда или респираторного тракта является не более чем иллюзией. Было показано, что нитросоединения не только стимулируют противогradientный транспорт  $\text{Ca}^{2+}$ , снижают внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$ , но модулируют хлорную и калиевую проводимости мембраны ГМК [Fuller C., Benos D. e.a., 1998; White R., e.a., 1993; Lovren F., Triggle C., 1998; Zhang Y e.a., 1998].

Экспериментальные исследования с применением нитросоединений позволили объяснить и некоторые стороны фармакологического действия лекарственных препаратов – доноров NO, многолетнее применение которых носило скорее эмпирический характер. В последние годы проведены первые доказательные исследования, посвященные важной проблеме лекарственной терапии нитросоединениями - развития толерантности при длительном использовании. Появились гипотезы, связывающие механизмы развития толерантности с цГМФ-зависимыми процессами в ГМК [Асташкин Е.И. с соав.,1997; Клещев Л.А. с соав.,1994; Parapetropoulos A.,e.a.,1998].

Вместе с тем, до настоящего времени нет ясности в вопросе влияния доноров оксида азота на основные внутриклеточные сигнальные системы и процессы их взаимодействия. Обсуждается возможность конкурентного взаимодействия цГМФ и цАМФ на уровне процессов их внутриклеточного метаболизма [Ковалев И.В. с соав.,2003; Медведева М.В.,1995; Jiang H.,e.a.,1993; Corbin J., e.a.,2000], что серьезно усложняет представления об эффекторных механизмах NO-опосредованного пути передачи сигнала. До сих пор нет четкого представления о влиянии нитросоединений на электрогенез ГМК различных внутренних органов. Практически отсутствуют сведения о действии этих агентов на сопряжение возбуждения-сокращения в ГМК.

Решение этих вопросов является актуальной проблемой молекулярной физиологии и биофизики клетки и насущной задачей фундаментальной медицины в плане углубления знаний о механизмах межклеточной и внутриклеточной сигнализации, а также действия нитросодержащих фармакологических препаратов на внутренние органы, сформированные гладкими мышцами и сосуды.

#### **ЦЕЛЬ РАБОТЫ:**

Изучить механизмы действия нитропруссиды натрия и нитроглицерина на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочевого пузыря и *taenia coli* морской свинки.

#### **ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

1) Исследовать влияние нитропруссиды натрия и нитроглицерина на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочевого пузыря и *taenia coli* морской свинки.

2) Изучить роль растворимой фракции гуанилатциклазы в механизмах действия нитропруссиды натрия и нитроглицерина на электрогенез и сокращения гладкомышечных клеток мочевого пузыря и *taenia coli* морской свинки.

3) Исследовать влияние нитросоединений и цГМФ на цАМФ - опосредованную регуляцию электрических и сократительных свойств гладкомышечных клеток.

4) Изучить роль С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы в регуляции циклическим гуанозинмонофосфатом электрических и сократительных свойств гладкомышечных клеток.

5) Исследовать роль  $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспорта и  $Na^+/H^+$ -обмена в механизмах действия нитросоединений на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток.

#### **ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:**

1. Угнетающее влияние нитроглицерина на сокращение гладкомышечных клеток мочевого пузыря, осуществляется как цГМФ-зависимым, так и цГМФ-независимым способом. Последний связан с угнетением нитроглицерином потенциал-зависимой кальциевой проводимости мембраны.

2. Нитропруссид натрия увеличивает длительность ПД и силу сократительных ответов ГМК мочеточника. Этот эффект опосредован цГМФ и обусловлен усилением потенциал-зависимой натриевой проводимости плазмалеммы и увеличением вклада фракции ионов кальция, освобождаемой из саркоплазматического ретикулума, в сокращения ГМК.

3. Потенциал-независимое действие нитропруссиды натрия на сокращения ГМК мочеточника опосредовано протеинкиназой-С, изменением внутриклеточного соотношения цГМФ/цАМФ и увеличением предзагрузки ионами кальция саркоплазматического ретикулума.

4. Нитропруссид натрия модулирует кальцийзависимую хлорную проводимость мембраны ГМК мочеточника за счет угнетения  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта.

### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА:**

Впервые изучено влияние донора оксида азота нитропруссиды натрия (НП) и нитроглицерина (НГ) на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника и *taenia coli* морской свинки. Установлено, что НГ и НП угнетают спонтанную и вызванную электрическую и сократительную активность ГМК *taenia coli*. В отличие от НП, НГ действует быстрее и в меньших концентрациях.

В механизмах действия НГ на электрогенез и сокращения ГМК впервые обнаружен цГМФ-независимый компонент, который связан с угнетением потенциал-зависимой кальциевой проводимости мембраны.

Впервые показано, что нитропруссид натрия усиливает сокращения ГМК мочеточника. Такое влияние НП опосредовано активацией ГЦ и связано с модуляцией потенциал-зависимой натриевой проводимости мембраны, изменением внутриклеточного соотношения цГМФ и цАМФ и увеличением предзагрузки ионами кальция саркоплазматического ретикулума ГМК. Существенная роль в стимуляции нитропруссидом натрия сокращений ГМК мочеточника принадлежит протеинкиназе-С.

Впервые показано, что в реализации эффектов НП на сопряжение возбуждения-сокращения в ГМК мочеточника участвуют  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмен,  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт и хлорная проводимость мембраны ГМК.

### **НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ:**

Полученные данные являются вкладом в развитие фундаментальных представлений о механизмах регуляции тонуса гладких мышц. Результаты исследования развивают представления о мембранных и молекулярных механизмах, используемых первичными и вторичными посредниками для регуляции сократительной функций гладких мышц. Полученные данные позволяют уточнить механизмы действия используемых в практике препаратов - нитросоединений на сократительные свойства гладких мышц и послужат важным звеном в создании теоретико-экспериментальной базы для разработки новых принципов коррекции патологических синдромов, связанных с нарушением сократительной функции гладкомышечных образований.

Основные положения работы используются в курсе лекций, читаемых на кафедре биофизики и функциональной диагностики и кафедре нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета, на кафедре физиологии человека и животных Томского государственного университета. Методические приемы и полученные данные используются в научных исследованиях, проводимых на кафедре биофизики и функциональной диагностики, кафедре нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета. Области применения полученных данных являются физиология, биофизика, фармакология.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертации обсуждены на VII, VIII, IX, XII, XIII национальных конгрессах по болезням органов дыхания (Москва, 1997, 1998, 1999, 2002, 2003); на международной конференции "Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы" (Томск, 1997); на XVII, XVIII и XIX съездах Всероссийского физиологического общества им. И.П. Павлова (Ростов-на-Дону, 1998, Казань, 2001, Екатеринбург, 2004); на II международном симпозиуме «Физико-химические основы функционирования белков и их комплексов» (Воронеж, 1998); на Уральской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Физика в биологии и медицине» (Екатеринбург, 1999); на международной конференции «Современные проблемы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 1999); на региональной научно-практической конференции, посвященной 150-летию со дня рождения И.П. Павлова (Томск, 1999), на конференции «Актуальные вопросы кардиологии» (Томск, 2000); межрегиональной научно-практической конференции «Проблемы нейрогуморальной регуляции физиологических функций висцеральных систем», посвященной 100-летию со дня рожд. проф. Д.Я. Криницина (Омск, ИВМ и ОмГАУ, 2000), на I, II, III, V конгрессах молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2000, 2001, 2002, 2004), II Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых медиков с международным участием (Владивосток, 2001), II Российской конференции молодых ученых с международным участием (Москва, 2001), IV съезде физиологов Сибири с международным участием (Новосибирск, 2002), 13 Европейском съезде по гипертензии (Милан, Италия, 2003), симпозиуме с международным участием «Мембранные и молекулярные механизмы регуляции функций гладких мышц» (Томск, 2004), на международном симпозиуме "Biological Motility. International Symposium" (Pushchino, Russia, 2004).

Основные результаты диссертации опубликованы в 43 печатных работах, в т.ч. 9 – в центральной и 1 – в зарубежной печати.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста. Состоит из введения, трех глав описания собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 34 рисунками. Список литературы содержит 289 источников, включая 89 отечественных и 200 иностранных авторов.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объектом исследования** служили изолированные препараты гладких мышц мочеочника и *taenia coli* морской свинки. Из очищенных от соединительной ткани мочеочников готовились сегменты, а из *taenia coli* – полоски длиной 10-12 мм.

Для одновременной регистрации электрической и сократительной активности ГМК использовалась методика двойного сахарозного моста [Артеменко Д.П. с соавт., 1982]. Отведение электрических потенциалов проводили с помощью неполяризующихся электродов. Механическое напряжение (МН) гладкомышечных полосок регистрировали механотроном 6МХ2Б в условиях, близких к изометрическим.

Отводимые сигналы после усиления подавались на АЦП (32 канала, разрядность -12 бит, отношение сигнал/шум - 70 дБ, частота дискретизации -2кГц) и обрабатывались с помощью IBM PC.

В качестве контрольных (100%) служили значения амплитуды анэлектротонического потенциала (АЭП), параметров потенциала действия (ПД) (амплитуда пиковой компоненты и длительность плато) и амплитуды сокращения ГМК в растворе

Кребса в ответ на электрический стимул или изменения мембранного потенциала (МП) и МН, полученные в растворе Кребса, содержащем 40 мМ хлорида калия.

Результаты исследований обрабатывались методом вариационной статистики. Для оценки достоверности различий парных выборок использовались критерии t-Стьюдента и Колмогорова-Смирнова.

Анализ кинетических характеристик изменений мембранного потенциала и механического напряжения гладкомышечных препаратов проводился по методу нелинейного оценивания Rosenbrock and quasi-Newton с помощью программы Statistica 6.0 for Windows фирмы Statsoft.

#### **Используемые растворы:**

Раствор сахарозы в концентрации 0,3 М на основе деионизированной воды с удельным сопротивлением не ниже 15 МОм\*см.

Раствор Кребса следующего состава (в мМ): NaCl- 120,4; KCl- 5,9; CaCl<sub>2</sub>- 2,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- 1,2; NaHCO<sub>3</sub> или трис(оксиметил)-аминометана- 15,5; MgCl<sub>2</sub>- 1,2; глюкозы - 11,5. pH растворов поддерживались в пределах 7,35 - 7,40; температуры- 37±0,1<sup>0</sup> С.

Модифицированные растворы Кребса:

1. Гиперкалиевый раствор с концентрацией KCl 40 мМ.
2. Безнатриевые растворы с эквимоллярным замещением NaCl на холинхлорид.

Тестирующие растворы готовились на основе раствора Кребса и его модификаций с добавлением соответствующих реактивов.

**Используемые реактивы:** сахароза, мезатон, гистамин, (все-Россия), метиленовый синий, нитропруссид натрия, буметанид, 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX), кальфостин С (Calphostin C), тапсигаргин (Thapsigargin, все- Sigma); нифлумовая кислота, SITS (4-acetoamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid), тетраэтиламмония хлорид (ТЭА) и форболовый эфир (ФМА-phorbol miristoyl-13-acetyl, все -Serva); нитроглицерин (Nitroject, SUN, Индия), дибутирил-цАМФ и дибутирил-цГМФ (Boehringer Mannheim GmbH, Германия), винпоцетин (Гедеон Рихтер).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Влияние нитросоединений на электрические и сократительные свойства гладкомышечных клеток.**

Исходное механическое напряжение (МН) и мембранный потенциал (МП) ГМК мочеточника при добавлении в перфузионный раствор нитропруссид натрия (НП) и нитроглицерина (НГ) в концентрациях 0,1-1000 мкМ не изменялись. Присутствие этих нитросоединений не влияло на вольт-амперные характеристики мембраны ГМК мочеточника. Эти данные свидетельствуют о том, что используемые нитросоединения не изменяют потенциал-зависимую калиевую проводимость мембраны ГМК.

При помещении ГМК в гиперкалиевый раствор (40 мМ), развивалась деполяризация мембраны, и росло механическое напряжение (рис.1). Полученные при этом изменения МП и МН были приняты в качестве контрольных значений (100%).

При добавлении нитросоединений в концентрациях 0,1-1000 мкМ предсокращенные хлоридом калия гладкомышечные препараты мочеточника и taenia coli морской свинки расслаблялись на фоне реполяризации мембраны ГМК (рис.1.).

Нитропруссид натрия (НП) и нитроглицерин (НГ), начиная с концентрации 1мкМ, вызывали достоверное и зависимое от дозы снижение МН и реполяризацию мембраны ГМК taenia coli и мочеточника морской свинки (рис.2). Величина расслабления этих гладких мышц при одинаковых концентрациях нитросоединений была различна. Анализ кривых доза-эффект позволил определить, что ЕС<sub>50</sub> НП для ГМК

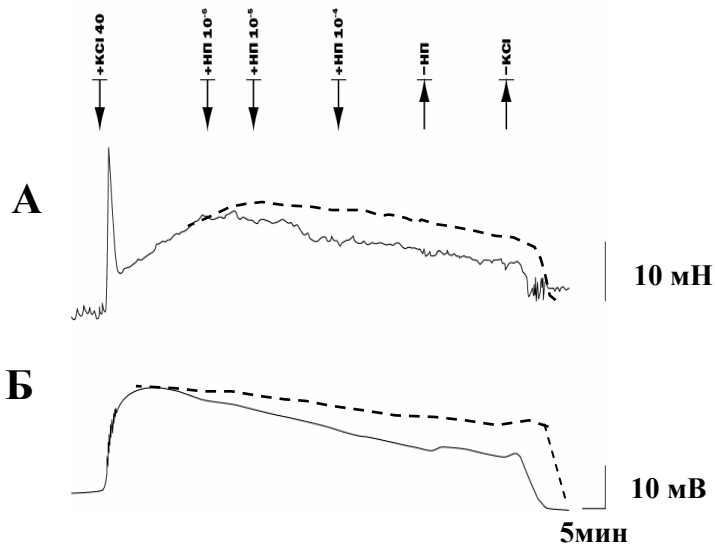


Рис.1. Влияние нитропруссид натрия (НП) на механическое напряжение (А) и мембранный потенциал (Б) гладкомышечных клеток *taenia coli* морской свинки, предсокращенных гиперкалиевым (KCl 40) раствором.

Стрелками обозначено начало и конец действия тестирующего вещества.

Прерывистой линией отмечены исходные электрические и сократительные ответы ГМК в отсутствии НП.

Справа - калибровочный сигнал и отметка времени.

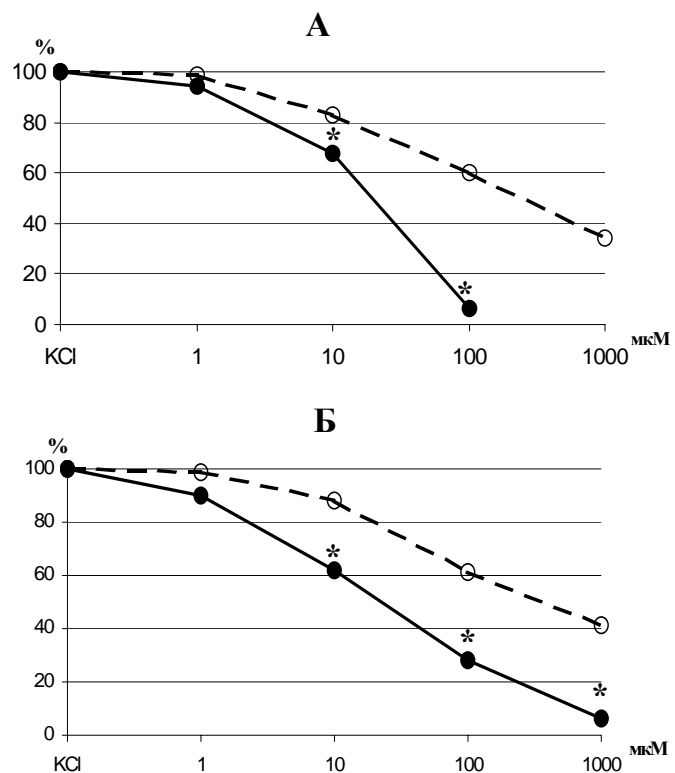
Рис.2. Влияние нитропруссид натрия и нитроглицерина на механическое напряжение (А) и мембранный потенциал (Б) ГМК *taenia coli*.

Пунктирной линией показано действие нитропруссид натрия, сплошной - нитроглицерина.

По оси абсцисс - концентрация нитросоединений в микромолях;

По оси ординат - величина механического напряжения и мембранного потенциала в % от контрольных значений в гиперкалиевом (40 мМ) растворе.

Звездочкой обозначены достоверно отличные значения ( $n=8; p<0,05$ ).



*taenia coli* была близка к 0,1 мМ, а для мочеочника - 1 мМ. Таким образом, чувствительность к НП была выше у ГМК *taenia coli*, чем мочеочника.

Нитроглицерин (НГ), (рис.2, сплошная линия), проявлял свое релаксирующее и реполяризирующее мембрану ГМК *taenia coli* влияние в более низких концентрациях, чем НП и через меньший промежуток времени: действие НГ происходило в течение 2-3, а НП - 5 мин. после их добавления в предсокращающий гиперкалиевый раствор.

Существующие отличия в действии НП и НГ, вероятнее всего, обусловлены мембранотропностью и/или особенностями их метаболизма, связанных с образованием нитрозотиолов-активаторов ГЦ [Григорьев Н.Б., с соавт., 1991; Северина И.С., 1995].

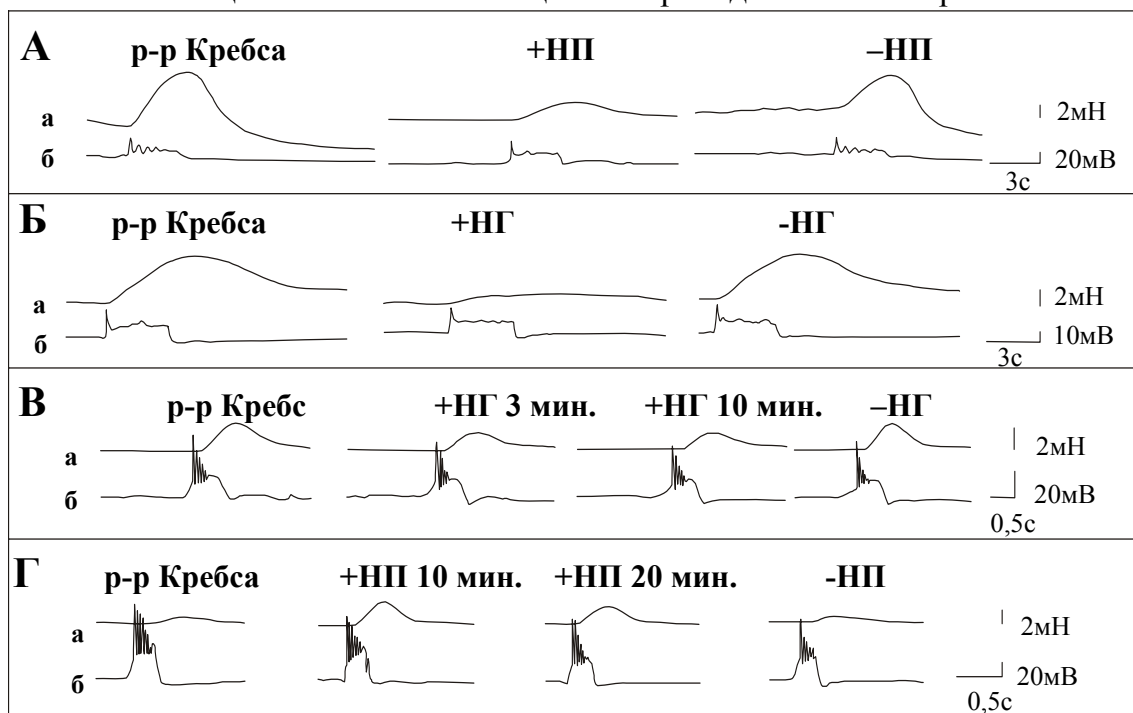
Анализ кинетических характеристик изменений МП и МН ГМК под влиянием НП и НГ с использованием двухкомпонентной модели получил статистическое подтверждение ( $R>0,999$ ) для ГМК *taenia coli*, составляя соответственно величины



0,99994; 0,99948; 0,99989 и 0,99979, но не для мочеточника: 0,97256; 0,99735; 0,99991 и 0,99994. По-видимому, нитросоединения могут влиять как минимум на два процесса входа и/или выхода катионов при осуществлении электромеханического сопряжения ГМК. С учетом особенностей ионной природы вызванных электрическим током ПД ГМК мочеточника [Кочемасова Н.Г.,1982] и *taenia coli* [Bulbring E.,Tomita T.,1970], проводились дальнейшие исследование эффектов нитросоединений.

Действие нитросоединений на спонтанные и вызванные электрическим стимулом потенциалы действия (ПД) и сокращения ГМК изучалось на гладкомышечных препаратах *taenia coli* и мочеточника морской свинки

В концентрациях 10 мкМ и выше НП и НГ угнетали спонтанную и вызванную электрическую и сократительную активность ГМК *taenia coli*. Однако угнетающее действие нитроглицерина было сильнее. В той же концентрации, что и НП (100 мкМ), НГ полностью угнетал не только спонтанную, но и вызванную электрическую и сократительную активность ГМК *taenia coli* (рис.3,А,Б). Величина анэлектротонических потенциалов при этом не изменялась. Поскольку ПД ГМК *taenia coli* имеют кальциевую природу [Bulbring E.,Tomita T.,1970], и сопротивление мембраны при действии нитросоединений не изменялось, такие эффекты, вероятнее всего, обусловлены подавлением потенциал-зависимой кальциевой проводимости мембраны ГМК.



**Рис.3. Влияние нитропруссид натрия и нитроглицерина на сократительную и электрическую активность ГМК *taenia coli* (А и Б) и мочеточника (В и Г) морской свинки.**

А и Г – действие 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП);

Б и В – действие 100 мкМ нитроглицерина (+НГ).

а - сократительная активность;

б - потенциалы действия.

Справа - калибровочный сигнал и отметка времени.

Вызванные электрическим стимулом ПД и сокращения ГМК мочеточника угнетались НГ, начиная с концентрации 10 мкМ (рис.3,В). 10 мкМ НГ на 3-5 мин снижало амплитуду сокращений до  $73 \pm 9\%$ , а длительность плато ПД до  $91 \pm 6\%$  от исходных в нормальном растворе Кребса. Этот эффект был обратим и зависел от концентрации НГ растворе: при 500 мкМ амплитуда сокращений ГМК снижалась относительно исходных до  $39 \pm 9\%$ , а длительность плато ПД до  $80 \pm 11\%$  ( $n=8, p<0,05$ ).

Иначе проявлялся эффект нитропруссид натрия (рис.3,Г). В концентрациях 0,01-50 мкМ его добавление не изменяло электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника, но в концентрации 100 мкМ НП увеличивал длительность плато ПД и амплитуду сокращений до  $111\pm 6\%$  и  $130\pm 7\%$  ( $n=17$ ;  $p<0.01$ ) соответственно от исходных значений в нормальном растворе Кребса.

## 2.Изучение роли гуанилатциклазы в механизмах действия нитропруссид натрия и нитроглицерина на электрические и сократительные свойства ГМК.

Реполаризующее и релаксирующее действие нитросоединений на ГМК может быть связано с их способностью освобождать оксид азота, который активирует растворимую фракцию гуанилатциклазы (ГЦ). Следовательно, вторичным посредником этого сигнального каскада, вероятнее всего, является циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) [Реутов В.П., Орлов С.Н., 1993; Северина И.С., 1995-1998].

Для изучения роли гуанилатциклазы в реализации эффектов НП, который освобождает NO, использовался ингибитор ГЦ метиленовый синий [Реутов В.П., Орлов С.Н. 1993; Северина И.С., 1995-1998; Drewett J., Garbers D., 1994; Wang Y., e.a., 1995].

Метиленовый синий (1-10 мкМ) не влиял на исходный уровень МП и МН ГМК, но полностью устранял релаксирующее и реполярирующее действие НП и ослаблял действие НГ на предсокращенные 40мМ хлорида калия гладкомышечные препараты. Вызванные электрическим стимулом ПД и сокращения ГМК мочеточника при добавлении в раствор Кребса 10 мкМ метиленового синего не изменялись (рис.4 А,Б), тогда как активирующее влияние НП на сокращения в этих условиях устранялось.

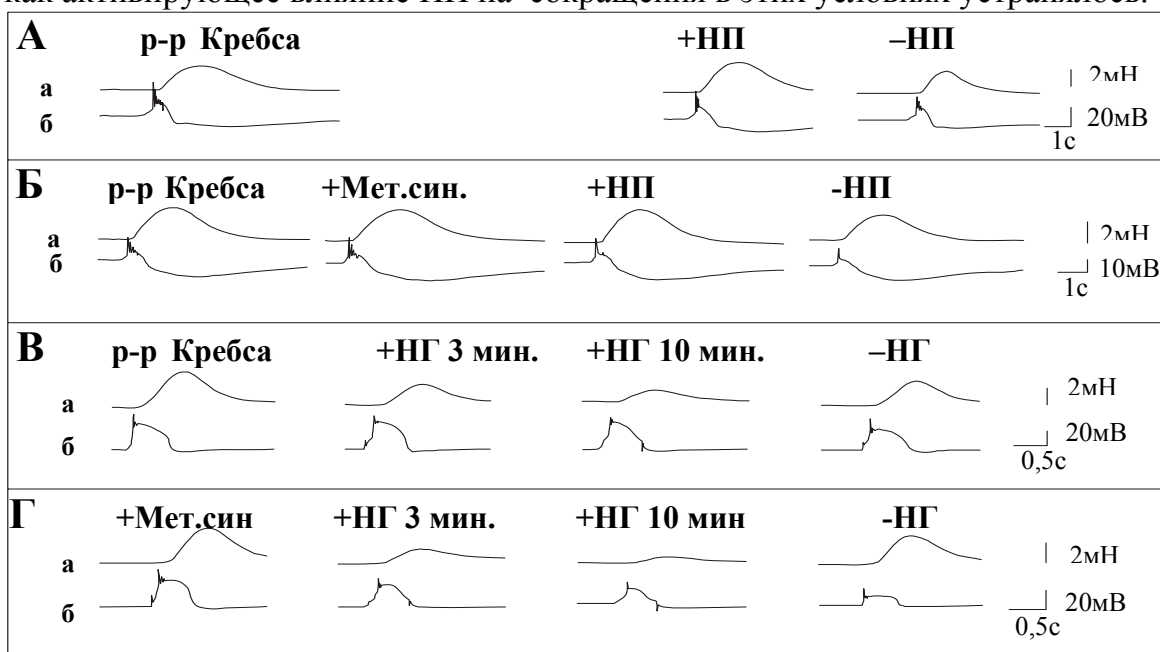


Рис. 4. Влияние нитропруссид натрия и нитроглицерина на сокращения и потенциалы действия ГМК мочеточника в присутствии метиленового синего.

А – действие 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП) в растворе Кребса.

Б – то же, что и А, но в присутствии 10 мкМ метиленового синего (+Мет.син.).

В – действие 100 мкМ нитроглицерина (+НГ);

Г – то же, что и В, но в присутствии 10 мкМ метиленового синего (+Мет.син.).

Остальные обозначения как на рис 3

Нитроглицерин, в отличие от нитропруссид натрия, продолжал угнетать ПД и сокращения ГМК мочеточника и в присутствии ингибитора ГЦ (рис.4, В,Г). После предобработки метиленовым синим, добавление 100 мкМ НГ приводило к снижению амплитуды сокращения и длительности плато ПД до величин  $58\pm 4\%$  и  $78\pm 5\%$  ( $n=8$ ,  $p<0,05$ ) соответственно. Эффект НГ был обратим и на фоне действия ингибитора ГЦ.

Полученные данные указывают на то, что основной мишенью для нитропруссид натрия в исследуемых ГМК является растворимая фракция ГЦ, поскольку эффекты этого нитросоединения полностью устранялись метиленовым синим.

Влияние нитроглицерина на ПД и сокращения ГМК мочеочника осуществляется и цГМФ- независимым способом.

### 3. Исследование влияния нитропруссид натрия на кальциевую систему регуляции электрической и сократительной активности ГМК.

Главенствующая роль кальциевой сигнальной системы в цикле сокращение-расслабление гладких мышц в настоящее время не вызывает сомнения [Шуба М.Ф. с соав.1984-1988; Kuriyama H. e.a.,1998]. Источниками ионов кальция, необходимых для активации и поддержания сокращения, являются внеклеточное пространство и внутриклеточные депо. Проводились исследования влияния НП на эффективность оперирования этого пути передачи сигнала в ГМК.

Для выделения кальциевой компоненты ПД ГМК мочеочника наружные ионы натрия замещались холинхлоридом, и в этих условиях ПД имели пиковый характер, обусловленный входом  $Ca^{2+}$  по потенциал-зависимым каналам [Кочемасова Н.Г.,1982].

Нитропруссид натрия (100 мкМ) уменьшал амплитуду кальциевых ПД и величину сокращений ГМК до  $85\pm 11\%$  и  $78\pm 12\%$  ( $n=8;p<0,05$ ), соответственно, относительно контрольных значений в безнатриевом растворе. ПД при этом продолжал изменяться так же, как и в безнатриевых растворах в отсутствии НП (рис.5).

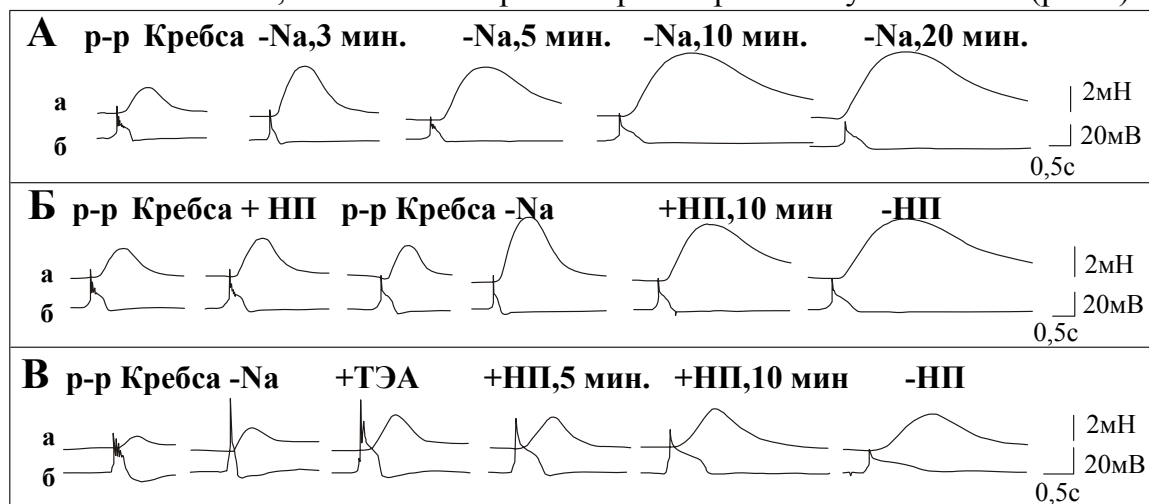


Рис.5 Влияние нитропруссид натрия на сокращения и потенциал действия ГМК мочеочника морской свинки в безнатриевых растворах.

А – ПД и сокращения в безнатриевом растворе в разный период времени,

Б – действие 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП) в растворе Кребса и безнатриевом растворе (-Na);

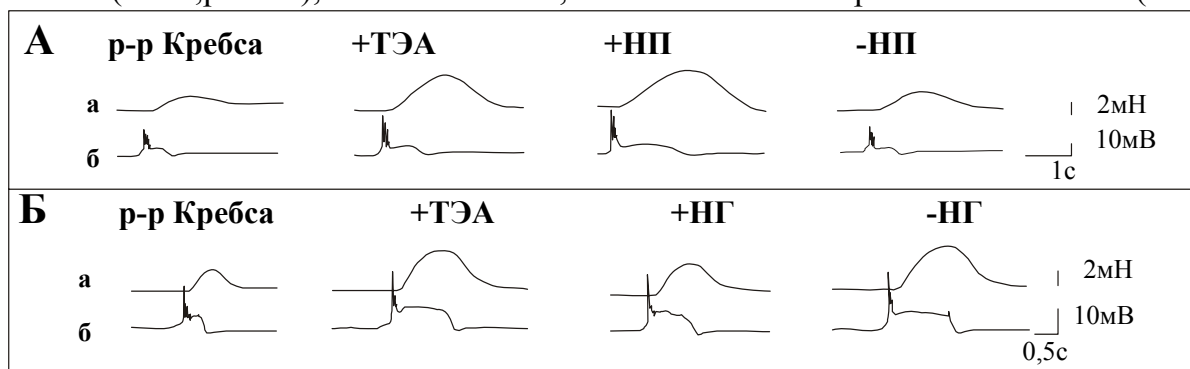
В – тоже, что Б, но на фоне 5 мМ тетраэтиламмония (+ТЭА).

Остальные обозначения как на рис.3

Такие изменения ПД и, как следствие, сокращений, могли быть связаны с прямым угнетением НП потенциал-зависимой кальциевой и/или с повышением калиевой проводимости мембраны ГМК. Для выяснения этого вопроса дополнительно использовался блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний (ТЭА) [Кочемасова Н.Г.,1982].

Добавление 5 мМ ТЭА в безнатриевый раствор (рис.5,В) приводило к появлению плато ПД и усилению сокращений ГМК мочеочника. В этих условиях угнетающее влияние НП на ПД и сокращения, характерное для безнатриевой среды, исчезало. По-видимому, изменения ПД, вызванные добавлением НП в безнатриевый раствор, обусловлены в первую очередь активацией калиевой проводимости мембраны ГМК.

Добавление блокатора калиевой проводимости тетраэтиламмония (5 мМ) [Imaizumi Y. e.a., 1981] в раствор Кребса вызывало увеличение амплитуды, длительности плато ПД и силы сокращений ГМК мочеточника до  $121\pm 9\%$ ,  $216\pm 23\%$  и  $157\pm 18\%$  ( $n=17; p<0.01$ ), соответственно, относительно контрольных значений (Рис.6)



**Рис.6. Влияние нитропруссид натрия и нитроглицерина на сокращения и потенциалы действия ГМК мочеточника морской свинки на фоне тетраэтиламмония.**

А - влияние 5 мМ тетраэтиламмония (+ТЭА) и 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП);  
 Б - то же, что А, но при добавлении 100 мкМ нитроглицерина (+НГ).  
 Остальные обозначения как на рис.3.

НП в концентрации 100 мкМ на фоне ТЭА дополнительно увеличивал амплитуду, длительность плато ПД и силу сокращений ГМК еще на  $11\pm 6\%$ ,  $21\pm 9\%$  и  $27\pm 6\%$  ( $n=17; p<0.01$ ) соответственно, относительно значений в присутствии ТЭА (рис.6,А).

НГ (100 мкМ) в присутствии 5 мМ ТЭА продолжал угнетать длительность плато ПД и амплитуду сокращений ГМК мочеточника до  $71\pm 11\%$  и  $74\pm 14\%$  ( $n=8; p<0.05$ ), соответственно, от значений в присутствии блокатора калиевых каналов (рис.6,Б).

Таким образом, в отличие от НГ, действие НП на электрическую и сократительную активность гладких мышц мочеточника в нормальном растворе Кребса обусловлено повышением натриевой и калиевой проводимостей мембраны ГМК.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в ГМК мочеточника эффекты НП в меньшей степени обусловлены изменениями калиевой проводимости мембраны, т.к. на фоне ТЭА НП вызывал усиление электрической и сократительной активности.

Это дает основания полагать, что в ГМК мочеточника нитроксид-зависимые процессы модулируют эффективность оперирования некоторых внутриклеточных сигнальных систем, либо один путь передачи сигнала, эффекты активации или ингибирования которого могут быть различны в зависимости от вида ГМК. Наиболее реальным кандидатом на эту роль является С-киназная ветвь кальциевой сигнальной системы [Баскаков М.Б., с соав., 1987-1988].

Влияние НП на внутриклеточные депо ионов кальция гладких мышц исследовалось с помощью ингибитора  $Ca^{2+}$ -АТФ-азы саркоплазматического ретикулула (СПР) тапсигаргина [Gomez-Viquez L., e.a., 2003; Yashiro Y., Duling B.R., 2003].

Тапсигаргин в концентрации 1 мкМ вызывал увеличение длительности плато ПД и усиление сокращений ГМК мочеточника, на  $83\pm 11\%$  и  $38\pm 8\%$  ( $n=8; p<0,05$ ), соответственно, относительно исходных в нормальном растворе Кребса (рис.7,Б).

В присутствии тапсигаргина активирующее действие нитропруссид натрия на сокращения ГМК мочеточника снижалось (рис.7,Б). Если амплитуда контрольных сокращений при действии НП возрастала до  $130\pm 7\%$  ( $n=11; p<0.01$ ) относительно исходных значений в растворе Кребса, то на фоне тапсигаргина НП сила сокращения снижалась до  $87\pm 6\%$  ( $n=6; p<0.05$ ) без изменения параметров ПД (рис.7,Б).

Известно, что внутриклеточные депо  $Ca^{2+}$  не играют столь значимой для сокра-

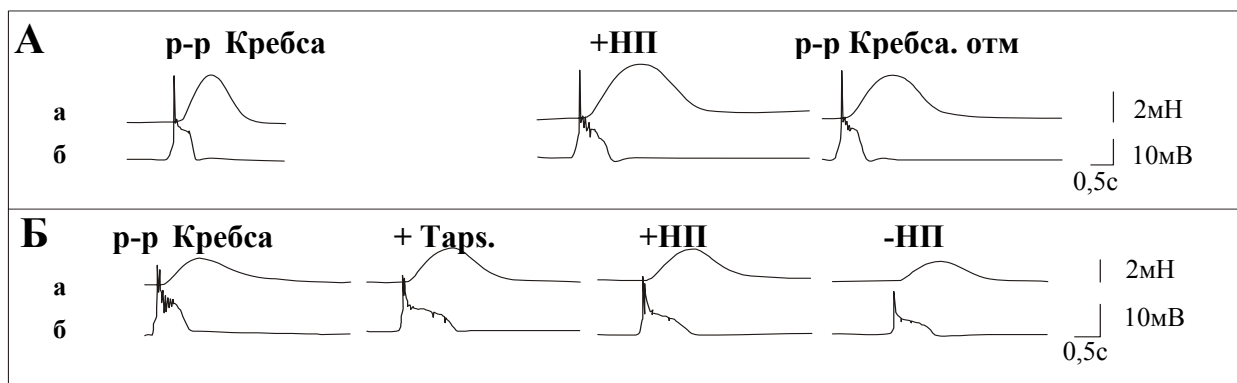


Рис. 7. Влияние тапсигаргина на эффекты нитропрусида натрия на сокращения (а) и потенциалы действия (б) мочеточника морской свинки:

А – действие 100 мкМ нитропрусида натрия (+НП) в растворе Кребса;

Б - то же, что А, но на фоне действия 1 мкМ тапсигаргина (+Taps)

Остальные обозначения как на рис. 3

щения ГМК мочеточника роли, которую выполняет его внеклеточный пул [Шуба М.Ф., Бурый В.А., 1984]. Увеличение длительности плато ПД после применения тапсигаргина свидетельствует о роли внутриклеточного кальция в электрогенезе ГМК мочеточника. Эффект тапсигаргина может быть обусловлен снижением кальций-зависимой компоненты калиевой проводимости мембраны ГМК и уменьшением ее ограничивающего влияния на длительность плато ПД. Ведущая роль  $Ca^{2+}$ , депонированных в СПР в активации  $Ca^{2+}$ -зависимой компоненты калиевой проводимости мембраны ГМК отмечена в недавних исследованиях [Cheranov S., 2002; Yashiro Y., 2003].

Важным является тот факт, что в присутствии ингибитора  $Ca^{2+}$ -АТФазы СПР снижалось активирующее действие НП на сокращения ГМК мочеточника. Эти данные свидетельствуют о том, что активация сократительного ответа ГМК мочеточника при действии НП, по крайней мере частично, обусловлена увеличением выхода фракции  $Ca^{2+}$ , освобождаемого из СПР. По-видимому, НП увеличивает предзагрузку ионами  $Ca^{2+}$  СПР ГМК мочеточника, что может быть связано со способностью цГМФ активировать кальциевый насос СПР ГМК [O'Donnel M., 1994; Popescu L. e.a., 1985].

#### 4. Исследование механизмов действия оксида на процессы регуляции протеинкиназой С электрических и сократительных свойств гладких мышц.

Хорошо известно, что стимуляция  $\alpha_1$ -адрено- и  $H_1$ -гистаминэргических рецепторов мембраны ведет к активации С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы [Rasmussen H, Waisman D., 1982; Berridge M., 1984; Lee M., Severson D., 1994]. Активация протеинкиназы-С (ПК-С) происходит при действии некоторых БАВ на рецепторы мембраны ГМК ( $\alpha_1$ ,  $H_1$ ,  $M_1$  и др.), стимуляцией G-белков и фосфолипазы-С [Lee M., Severson D., 1994; Murthy K., e.a., 1998-2000; Somlyo A.P., Somlyo A.V., 1994].

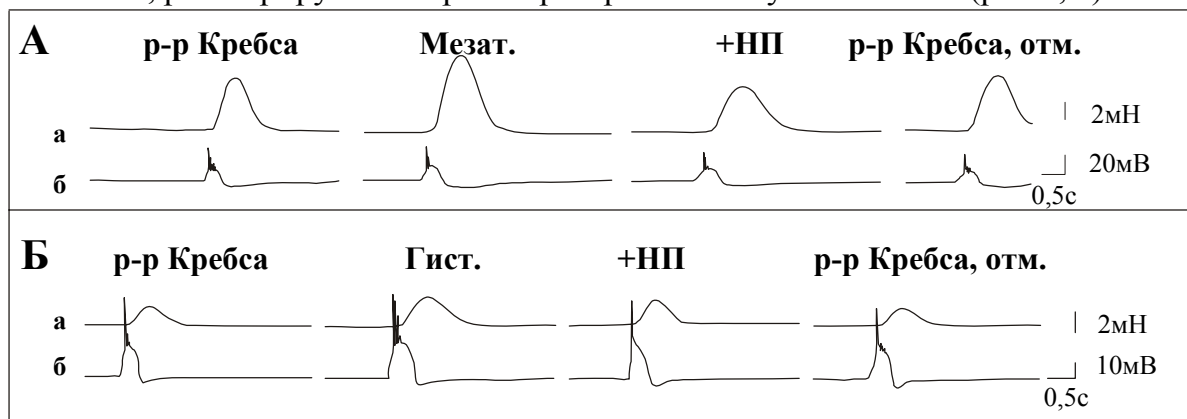
В соответствии с классической схемой возбуждающее действие агонистов рецепторов на ГМК обусловлено открыванием малоселективных рецептор-управляемых ионных каналов и селективных кальциевых рецептор-управляемых ионных каналов, деполаризующих мембрану, потенциал-зависимых кальциевых каналов и освобождению ионов кальция из внутриклеточного депо [Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г., 1988].

Влияние НП на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника на фоне БАВ изучалось в присутствии гистамина и мезатона (рис.8).

Добавление в раствор Кребса 10 мкМ мезатона на 3-5 мин. привело к увеличению длительности плато ПД и амплитуды сокращения ГМК мочеточника на  $51 \pm 19\%$  и  $88 \pm 28\%$  ( $n=16$ ;  $p<0.01$ ) соответственно, относительно контрольных значений.

На фоне мезатона НП (100 мкМ) вызывал снижение амплитуды сокращения ГМК

до значений, регистрируемых в растворе Кребса в отсутствии БАВ (рис.8,А).



**Рис.8 Влияние 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП) на сокращения и потенциалы действия ГМК мочеточника морской свинки в присутствии биологически активных веществ:**

А- действие на фоне 10 мкМ мезатона (+Мезат.),

Б- действие на фоне 10 мкМ гистамина (+Гистам.).

Остальные обозначения как на рис.3

Подобный эффект был получен и при использовании 10 мкМ гистамина. Гистамин увеличивал длительность плато ПД и амплитуду сокращений ГМК на  $61 \pm 25\%$  и  $104 \pm 23\%$  ( $n=11$ ;  $p < 0.01$ ) соответственно выше исходных. При действии НП (100 мкМ) электрическая и сократительная активность ГМК снижалась до значений, близких к исходным, регистрируемым в отсутствии БАВ (рис.8,Б).

Эти данные свидетельствуют о том, что применение БАВ устраняет активирующий эффект нитросоединений на плато ПД и сокращения ГМК мочеточника. Таким образом, активация рецептор-управляемого входа  $Ca^{2+}$ , сопряженного с метаболизмом фосфоинозитидов, потенцировало угнетающий эффект НП.

Известно, что мезатон и гистамин активируют обе ветви кальциевой сигнальной системы: кальмодулин-зависимую и С-киназную [Rasmussen H., Waisman D., 1982; Somlyo A.P., Somlyo A.V., 1994]. Значимость ПК-С в эффектах НП согласуется с данными о том, что цГМФ может угнетать метаболизм мембранных фосфоинозитидов [Реутов В.П., Орлов С.Н., 1993; Millard S., e.a., 1998; Murthy K., e.a., 2000].

Как показано в работах М.Б. Баскакова с соав. (1987-1988), в ГМК мочеточника и *taenia coli* С-киназная система регуляции электрической и сократительной активности использует эффекторные механизмы отличные от тех, которые оперируют в других ГМК. Включение этого внутриклеточного пути передачи сигналов ведет к угнетению электрической и сократительной активности за счет повышения калиевой проводимости мембраны вследствие стимуляции натрий-протонного обмена.

Для выяснения роли С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы в механизмах действия НП на электрогенез и сокращения ГМК мочеточника использовался активатор ПК-С форболмиристатацетат (ФМА) и ее ингибитор кальфостин С [Fan J., Vuyon K., 2001; Coats P., e.a., 2001] (рис.9).

ФМА, в концентрации 0,5 мкМ к 25 мин. необратимо снижал амплитуду, длительность ПД и силу сокращений ГМК мочеточника до  $89 \pm 7\%$ ,  $77 \pm 9\%$  и  $69 \pm 11\%$  ( $n=6$ ;  $p < 0,05$ ), соответственно, относительно исходных в растворе Кребса.

При увеличении концентрации ФМА до 1 мкМ угнетающий эффект нарастал до величин  $80 \pm 7\%$ ,  $70 \pm 7\%$  и  $45 \pm 9\%$  ( $n=6$ ;  $p < 0,05$ ) соответственно (рис.9,Б).

ТЭА (5мМ) снижал влияние ФМА на ПД и сокращения ГМК мочеточника.

Нитропруссид натрия (100 мкМ) после предобработки ГМК форболовым эфиром вместо стимуляции (рис.9,А) сокращений вызывал их угнетение (рис.9,Б).

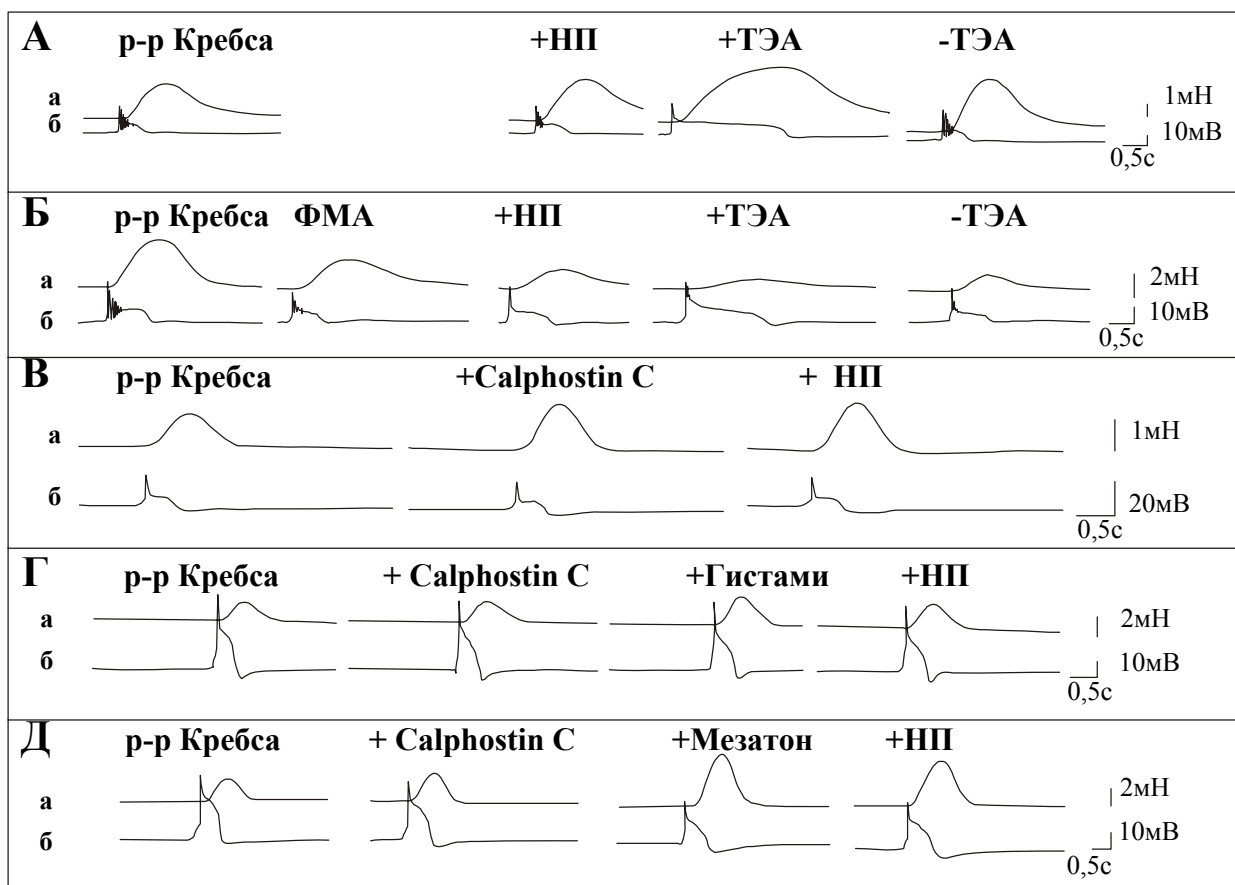


Рис. 9. Влияние активности протеинкиназы С и нитропруссид натрия на сокращения (а) и потенциалы действия (б) ГМК мочеточника морской свинки: А–действие 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП) и 5 мМ тетраэтиламмония (+ТЭА); Б – тоже, что А, но на фоне 1 мкМ активатора ПК-С форболового эфира (+ФМА); В – тоже, что А, но на фоне 0,1 мкМ ингибитора ПК-С кальфостина (+Calphostin); Г – тоже, что В, но на фоне действия 10 мкМ гистамина; Д – тоже, что В, но на фоне действия 10 мкМ мезатона. Остальные обозначения как на рис.3

Кальфостин С в концентрации 0,1мкМ на 5-7 мин. действия вызывал усиление сокращений ГМК мочеточника до  $110 \pm 9\%$  ( $n=6; p<0,05$ ) относительно исходных значений. Добавление нитропруссид натрия на фоне кальфостина-С 100 мкМ не приводило к характерной для мочеточника активации сокращения (рис.9,В).

Для дифференцировки эффектов оксида азота, опосредованных изменениями ионной проводимости мембраны ГМК и обусловленных модуляцией С-киназного пути передачи сигнала, были проведены эксперименты с БАВ.

БАВ на фоне действия кальфостина С (0,1мкМ) продолжали оказывать активирующее действие на ПД и сокращения ГМК мочеточника (рис.9, Г,Д).

Гистамин (10 мкМ) на фоне кальфостина С увеличивал длительность плато ПД и амплитуду сокращений на  $43 \pm 7\%$  и  $63 \pm 11\%$  соответственно. Подобный эффект был характерен и для мезатона, добавление которого после кальфостина С вызывало увеличение длительности плато и амплитуды сокращений ГМК мочеточника дополнительно на  $42 \pm 8\%$  и  $85 \pm 15\%$  ( $n=6; p<0,05$ ).

Нитропруссид натрия на фоне кальфостина С и используемых БАВ не оказывал никакого влияния на ПД и сокращения ГМК мочеточника. Следовательно, выключение С-киназной ветви кальциевой регуляции кальфостинном С устраняло эффекты донора оксида азота – нитропруссид натрия на ГМК мочеточника (рис.9, Г,Д).

Полученные данные свидетельствуют о том, что сигнальная система, опосре-

дованная метаболизмом фосфоинозитидов и активацией ПК-C, является одним из ключевых звеньев в реализации влияния NO на сокращения ГМК мочеточника.

Такое заключение согласуется с имеющимися литературными данными, в которых авторы сообщают об угнетении циклическим гуанозинмонофосфатом фосфолипазы C [Реутов В.П., Орлов С.Н., 1993; Murthy K., e.a., 1998, 1999], одного из ключевых ферментов фосфоинозитидного обмена [Lee M., Severson D., 1994].

### 5. Изучение влияния NO на изменения электрической и сократительной активности, вызванные стимуляцией цАМФ –зависимой сигнальной системы.

В ГМК уровень цАМФ и цГМФ определяется сочетанной активностью ферментов их синтеза и деградации фосфодиэстеразами (ФДЭ) циклических нуклеотидов.

Использовались ингибиторы ФДЭ 3-изобутил-1-метилксантин (ИБМХ) и винпоцетин [Медведева М.В. 1995; Jiang H., e.a., 1993; Kiss B; Karpati E. 1996].

ИБМХ в концентрации 10 мкМ снижал длительность плато ПД и амплитуду сокращений ГМК до  $68 \pm 11\%$  и  $56 \pm 8\%$  ( $n=6; p<0,05$ ), соответственно (рис.10, А).

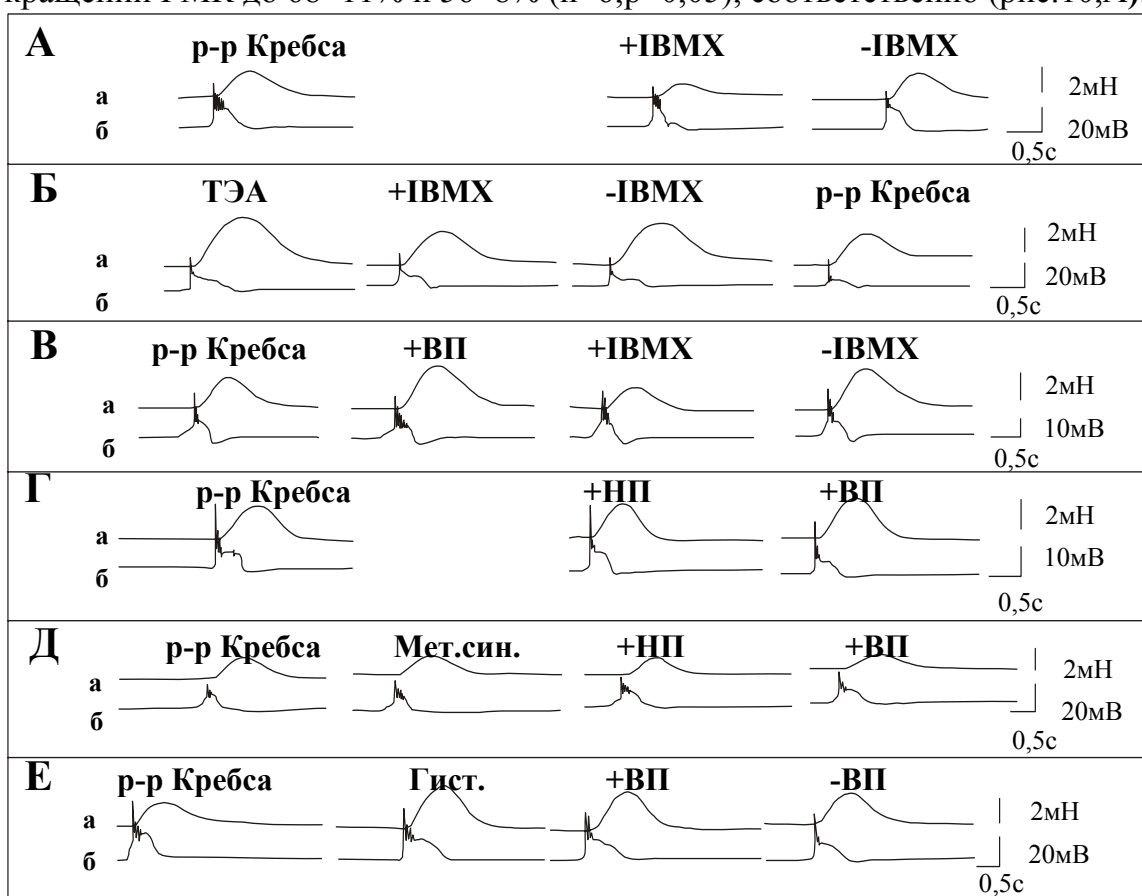


Рис. 10. Влияние нитропруссид натрия и ингибиторов фосфодиэстеразы на сокращения и потенциалы действия ГМК мочеточника морской свинки

А-действие 10 мкМ 3-изобутил-1- метилксантина (+ИБМХ);

Б-то же , что А, но на фоне действия 5 мМ тетраэтиламмония (ТЭА);

В-то же, что А, но на фоне действия 1 мкМ винпоцетина (+ВП).

Г-действие 1 мкМ ВП на фоне 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП);

Д-то же, что Г, но на фоне действия 10 мкМ метиленового синего (+ Мет.син.);

Е – то же, что А, но на фоне действия 10 мкМ гистамина (+Гис.).

Остальные обозначения как на рис.3.

В присутствии тетраэтиламмония (ТЭА, 5 мМ) угнетающее влияние ИБМХ на ПД и сокращения ГМК мочеточника достоверно снижалось. Длительность плато ПД составляла  $85 \pm 10\%$ , а амплитуда сокращений  $89 \pm 8\%$  ( $n=6; p<0,05$ ) от контрольных



значений действия ТЭА (рис.10,Б). Полученные данные указывают на то, что эффекты IBMX обусловлены повышением калиевой проводимости мембраны ГМК.

Винпоцетин (ВП) в концентрации 1 мкМ оказывал противоположный IBMX эффект: происходило увеличение амплитуды сокращений ГМК на  $33\pm 7\%$ , а длительность плато ПД при этом уменьшалась на  $22\pm 9\%$  ( $n=6; p<0,05$ ) относительно контрольных значений в растворе Кребса (рис.10,В).

IBMX (10мкМ) на фоне винпоцетина снижал длительность плато и амплитуду сокращений ГМК до  $69\pm 8\%$  и  $58\pm 8\%$ , ( $n=6; p<0,05$ ) соответственно, что свидетельствует о различии внутриклеточных мишеней, используемых этими соединениями.

Действие винпоцетина (1 мкМ) изучалось в присутствии 100 мкМ НП и 10 мкМ метиленового синего (рис.10,Д).

На фоне усиления сокращения ГМК мочеточника 100 мкМ НП на  $30\pm 7\%$  ( $n=11; p<0.01$ ) добавление 1 мкМ ВП вызывало дополнительное увеличение амплитуды сокращения еще на  $18\pm 8\%$  ( $n=6; p<0.05$ ). В присутствии метиленового синего активирующее действие НП и ВП на ГМК мочеточника устранялось (рис.10,Д).

При обратной последовательности применения этих тестирующих агентов после действия винпоцетина ( $33\pm 7\%$ ) НП дополнительно повышал амплитуду сокращения ГМК мочеточника еще на  $16\pm 5\%$  ( $n=6; p<0,05$ ). При проведении предобработки метиленовым синим эффекты ВП и НП значительно подавлялись.

Эти данные дают основания полагать, что стимулирующее влияние ВП на сокращения ГМК мочеточника, также как и НП, обусловлено увеличением внутриклеточной концентрации цГМФ. В случае действия НП, это достигается активацией растворимой фракции ГЦ, а ВП - ингибированием процесса гидролиза цГМФ. Если это действительно так, то в присутствии БАВ эффекты ингибитора ФДЭ на ПД и сокращения ГМК мочеточника морской свинки должны имитировать действие НП (рис.3).

На фоне 10 мкМ мезатона и гистамина активирующее сокращение влияние винпоцетина становилось противоположным: происходило угнетение сокращений и укорочение плато ПД (Рис.10,Е), как и в случае с нитропруссидом натрия (рис.8). Можно предположить, что эффекты НП и ВП связаны с повышением уровня цГМФ в цитоплазме ГМК и угнетением С-киназной системы кальциевой регуляции.

Обращение эффектов винпоцетина и НП в присутствии БАВ может быть обусловлено тем, что, оксид азота, как указывалось выше, используя в качестве вторичного посредника цГМФ, повышает натриевую и калиевую проводимости мембраны и снижает эффективность оперирования С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы ГМК. Суперпозиция этих влияний на ПД и сокращения определяет функциональный конечный ответ ГМК мочеточника на тестирующие вещества.

Если, в интактных ГМК доминируют эффекты ослабления угнетающего влияния ПК-С на ПД и сокращения, то в условиях активации гистамином натриевой проводимости и снижения кальциевой проводимости мезатоном именно они становятся доминирующими в эффектах NO.

Дальнейший анализ действия циклических нуклеотидов на электрические и сократительные свойства ГМК проводился с использованием проникающих аналогов цАМФ и цГМФ (рис.11).

Дибутирил-цАМФ (10 мкМ) вызывал, подобно IBMX, угнетение сокращения ГМК (рис.11, А), тогда как дибутирил-цГМФ (100 мкМ и 500 мкМ), также как НП и ВП, активировал сокращения ГМК мочеточника (рис.11,В). Обнаружено, что эффекты дибутирил-цАМФ, но не цГМФ, изменяли свою миогенную направленность при 10-ти кратном увеличении концентрации: 100 мкМ дибутирил-цАМФ усиливал сок-

ращение ГМК мочеточника при снижении длительности плато ПД (рис.11, А и Б).

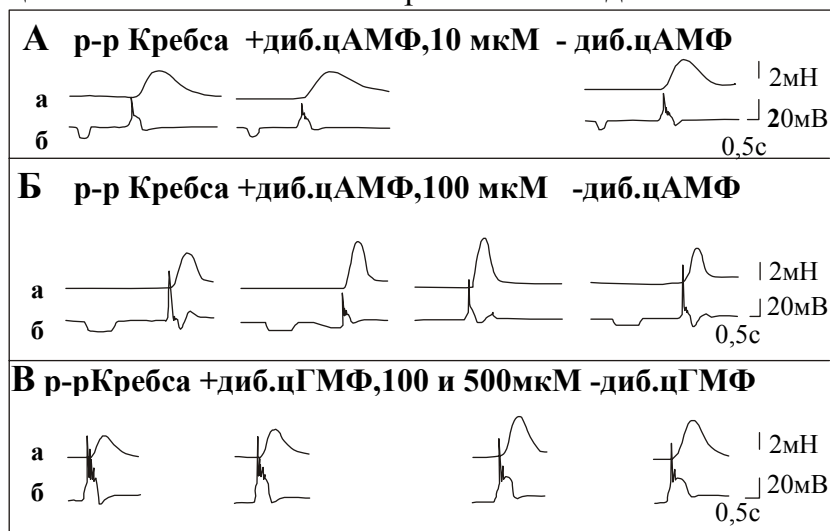


Рис.11. Влияние проникающих аналогов циклических нуклеотидов на сокращения (а) и потенциалы действия (б) ГМК мочеточника морской свинки.

А- действие 10 мкМ дибутирил-цАМФ

Б- действие 100 мкМ дибутирил-цАМФ

В- действие 100 и 500 мкМ дибутирил-цГМФ

Остальные обозначения как на рис.3.

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о возможности независимого и разнонаправленного действия цГМФ- и цАМФ на сопряжение возбуждения-сокращения в ГМК мочеточника при определенных концентрационных соотношениях этих циклических нуклеотидов в клетке. Суперпозиция эффектов ЦН в значительной степени определяет направленность изменений электрогенеза и сокращений ГМК. При этом цАМФ снижает длительность плато ПД и угнетает сокращение за счет активации калиевой проводимости мембраны, а цГМФ усиливает сокращения ГМК, повышая при этом еще и натриевую проницаемость мембраны.

Активация сокращений ГМК мочеточника циклическим гуанозинмонофосфатом может быть связана с увеличением вклада ретикулярного кальция в генерацию сокращения изучаемой гладкой мышцы, а также с ингибированием ПК С.

#### 6. Влияние нитропрусида натрия на $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмен, $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорт и хлорную проводимость мембраны ГМК мочеточника.

В последние годы активно обсуждается роль и место  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена,  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорта и хлорной проводимости мембраны ГМК в качестве эффекторных систем при различных воздействиях физических факторов и БАВ [Акаг F., e.a. 1999,2001; Kitamura K., Yamazaki J.,2001.; O'Neill W.,1997; Russell J.,2000].

В качестве модулятора натрий-протонного обмена был использован  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в концентрации 10 мМ, добавление которого в раствор Кребса практически не изменяло ПД и сокращения ГМК мочеточника, хотя вызывало подщелачивание вне- и, последовательно, внутриклеточной среды [Баскаков М.Б., Медведев М.А., Ходоров Б.И.,1987]. При удалении  $\text{NH}_4\text{Cl}$  из раствора длительность плато ПД и амплитуда сокращений возрастала до величин  $133 \pm 12\%$  и  $141 \pm 14\%$  ( $n=9$ ;  $p<0.05$ ) (рис.12, А), соответственно, из-за угнетения  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена и калиевой проводимости мембраны ГМК.

На фоне добавления 100 мкМ НП фаза активации плато ПД и сокращений укорачивалась и становилась более выраженной, достигая величин  $138 \pm 12\%$  и  $178 \pm 12\%$  ( $n=9$ ;  $p<0.05$ ), соответственно (рис.12,Б). Таким образом, фаза усиления электрической и сократительной активности ГМК мочеточника при удалении  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , связанная с угнетением  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена и калиевой проводимости мембраны, сменялась угнетением ПД и сокращений, обусловленных активацией этих процессов.

Усиление фазы активации сокращений ГМК на фоне НП может свидетельствовать о дополнительном цГМФ-зависимом угнетающем влиянии ПК-С и/или одной из основных ее эффекторных систем -  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена [Баскаков М.Б. с соав., 1987].

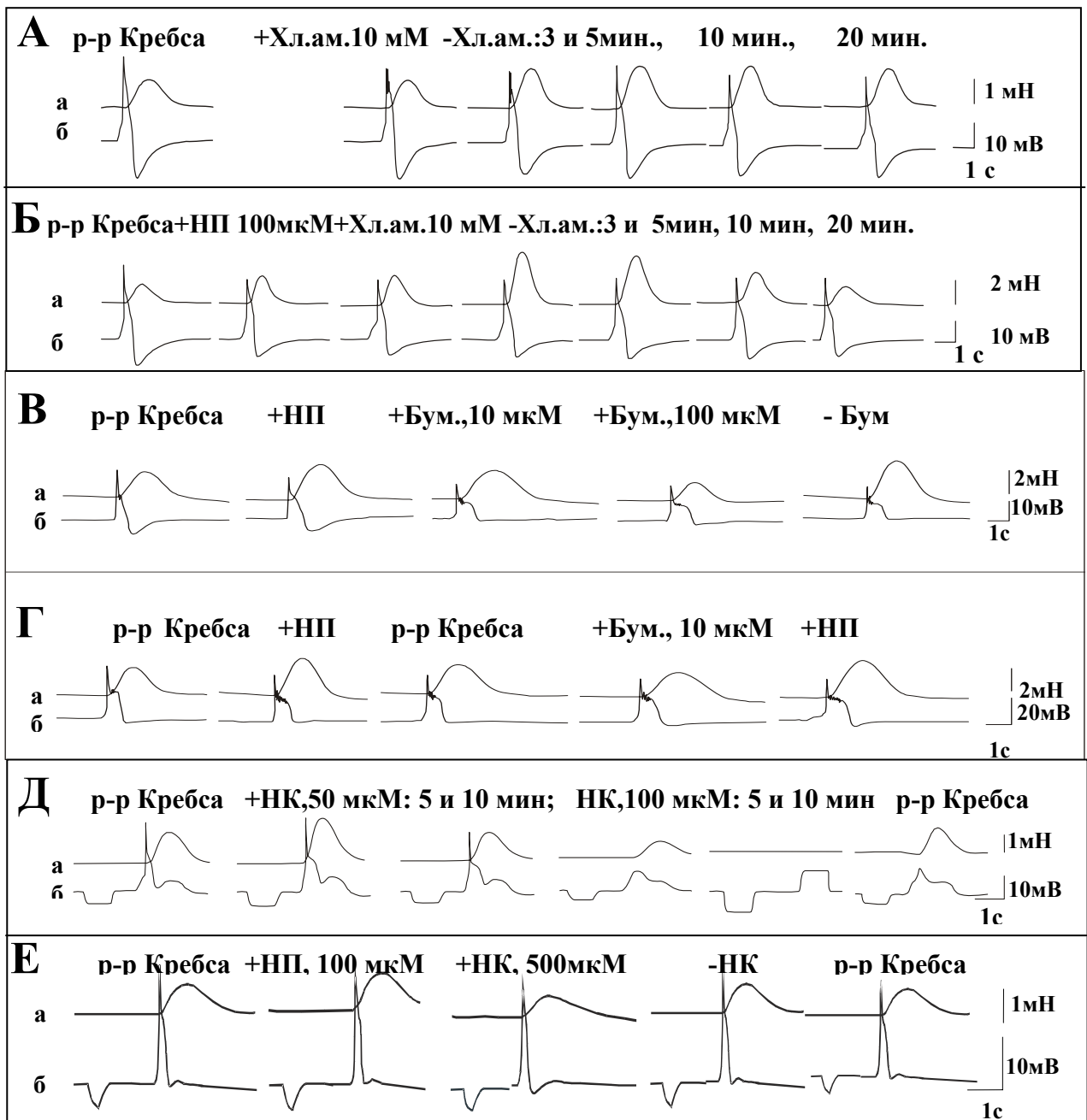


Рис.12. Влияние нитропруссид натрия на сокращения и потенциалы действия ГМК мочеточника на фоне изменения активности  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена,  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорта и хлорной проводимости мембраны.

А–действие 10мМ хлорида аммония (+Хл.ам) и последующее его удаление (-Хл.ам);

Б – то же, что А, но на фоне 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП);

В- действие 10 и 100 мкМ буметанида (+Бум.) на фоне 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП);

Г-действие 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП) до и после добавления 10 мкМ буметанида (+Бум.);

Д - действие 50 и 100 мкМ нифлумовой кислоты (+НК);

Е -то же, что Д, но на фоне 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП);

Остальные обозначения как на рис.3.

С другой стороны, подщелачивание внутриклеточной среды может быть причиной непродолжительного влияния на ПД и сокращения ГМК фазы удаления из раствора  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , так как нитропруссид натрия теряет способности активировать ГЦ при рН выше 7,6 [Клещев Л.А. с соав.,1994].

Для исследования  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  - котранспорта был использован его селективный ингибитор – буметанид [Orlov, S., e.a. 1996; Akar F., e.a. 1999,2001].

Добавление в раствор Кребса 10 мкМ буметанида на 8-10 мин. вызывало ги-

перполяризации мембраны и снижению силы вызванных электрическим стимулом сокращений до  $83 \pm 12\%$  ( $n=9$ ;  $p<0.05$ ) относительно исходных значений.

После предобработки буметанидом (10 мкМ) активирующий сокращение ГМК мочеточника эффект НП ( $130 \pm 9\%$ ) ослаблялся до  $111 \pm 7\%$  ( $n=11$ ;  $p<0,05$ ) (рис.12,Г). Эти данные подтверждают то, что одним из эффекторов НП является  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт, угнетение которого приводит к снижению электрической и сократительной активности ГМК мочеточника морской свинки. Так как имеются сведения о способности буметанида играть роль антагониста хлорной проницаемости мембраны в ГМК, эффекты НП изучались в присутствии блокатора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой хлорной проводимости мембраны нифлумовой кислоты [Criddle D., e.a., 2002; Piper A., e.a., 2002].

В присутствии 100 мкМ НП угнетающее влияние нифлумовой кислоты на электрическую и сократительную активность ГМК ослаблялось. На фоне НП ее добавление в концентрации 500 мкМ снижало амплитуду ПД и сокращений ГМК до  $78.0 \pm 8.5\%$  и  $64.5 \pm 8.2\%$  ( $n=9$ ,  $p<0.01$ ) (Рис.12, Е) соответственно, а в отсутствии нитросоединения нифлумовая кислота уже в концентрации 100 мкМ вызывала полное угнетение ПД и сокращений ГМК мочеточника (Рис12,Д).

По-видимому, ослабление угнетающего эффекта блокатора кальций-зависимой хлорной проводимости мембраны ГМК на фоне НП могло быть обусловлено уменьшением вклада хлорных токов в генерацию ПД в результате угнетения нитропруссидом натрия активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта и, как следствие, снижения направленного наружу электрохимического потенциала для анионов  $\text{Cl}^-$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования процессов активации и поддержания сократительного ответа однозначно указывают на то, что изменения уровня цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  играет главенствующую роль в цикле сокращение-расслабление гладких мышц и проблема регуляции сокращения ГМК является, в сущности, проблемой регуляции метаболизма внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  [Баскаков М.Б. с соавт., 1988-2001; Ткачук В.А., 1998; Kuriyama H., e.a., 1998]. Уровень свободного внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  модулируется многочисленными ФАВ и БАВ: гормонами, медиаторами, простагландинами и лекарственными веществами. Взаимодействуя со специфическими мембранными рецепторами, эти соединения запускают внутриклеточные пути передачи сигнала. Вторичные посредники оперируют целым арсеналом эффекторных систем клетки: ионными каналами, насосами, ион-транспортирующими системами, некоторыми ферментами [Баскаков М.Б. с соав., 1988; Ткачук В.А., 1998; Somlyo A.P., Somlyo A.V., 1994; Kuriyama H., e.a., 1998].

В большинстве случаев цГМФ-опосредованные механизмы регуляции метаболизма  $\text{Ca}^{2+}$  имеют ряд особенностей. Прежде всего, они запускаются NO, который активирует непосредственно фермент - растворимую фракцию гуанилатциклазы (ГЦ), минуя рецепторы плазматической или внутриклеточных мембран [Furchgott R., Vanhoutte P., 1989; Luscher T., 1989; Moncada S., 1992]. Именно ГЦ, как показали проведенные исследования, является мишенью для NO.

Характерной чертой сопряжения возбуждения-сокращения в ГМК, как и в кардиомиоцитах, является использование внеклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ , которые участвуют как в процессах возбуждения (генерация ПД), так и активации сокращения. При возбуждающем действии агонистов вход  $\text{Ca}^{2+}$  из внешней среды в ГМК осуществляется по двум типам кальциевых каналов: рецептор-управляемым, стимулируемым биологически активными веществами, и потенциал-зависимым, открывающимся при деполяризации мембраны [Шуба М.Ф., Бурый В.А., 1984; Kuriyama H., e.a., 1998].

Расслабляющее действие нитросоединений и угнетение сокращений ГМК мог-

ло быть связано с уменьшением входящих токов  $\text{Ca}^{2+}$ . Проведенные исследования показали, что донор NO НП, в отличие от НГ, не оказывал прямого влияния на потенциал-зависимые и рецептор-управляемые пути входа  $\text{Ca}^{2+}$  в ГМК. Ограничение потенциал-зависимого потока  $\text{Ca}^{2+}$  является следствием повышения калиевой проводимости мембраны, ее реполяризации и закрывания части потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов или ограничения длительности ПД в случае вызванной стимулом электрической и сократительной активности [Шуба М.Ф., Бурый В.А., 1984; Benham C., Bolton T., 1986].

Из экспериментов с блокаторами калиевых каналов и анализа вольт-амперных характеристик мембраны изучаемых ГМК следует, что цГМФ –зависимые процессы модулируют  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемую компоненту калиевой проводимости мембраны. Эти данные согласуются с точкой зрения М.Ф.Шубы (1984) на то, что в ГМК изменения калиевой проводимости, в отличие от других электровозбудимых структур, играют доминирующую роль в реализации различных регуляторных воздействий.

Эксперименты с безнатриевыми и содержащими ТЭА растворами показали, что увеличение длительности плато ПД ГМК мочеточника, при действии НП/НО, может быть обусловлено повышением натриевой проводимости, сопровождаемой некоторым ростом кальций-активируемой компоненты калиевой проводимости мембраны.

Другим фактором, влияющим на потенциал-зависимый вход ионов кальция, являются кальций-активируемые хлорные токи [Brayden J., 1996; Kitamura K., Yamazaki J., 2001], значимость которых для ГМК мочеточника подтверждают эксперименты с их блокатором - нифлумовой кислотой. Принципиальным отличием ГМК от других электровозбудимых структур является наличие высокого электрохимического потенциала для ионов хлора, направленного наружу [Kuriyama H., e.a., 1998], который в основном поддерживается посредством  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта [Akar F., e.a., 1999-2001; O'Neill, W., 1999; Russell J., 2000]. Так как НП, как и ингибитор этого котранспорта буметанид, снижают влияние блокатора хлорных токов, можно предположить, что действие NO на ПД и сокращения ГМК мочеточника обусловлено, по крайней мере, частично уменьшением хлорного тока вследствие снижения электрохимического потенциала для этих анионов из-за угнетения  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта.

Известно, что внутриклеточные депо ионов кальция, в том числе, саркоплазматический ретикулум (СПР), не играют значимой роли в сокращении большинства ГМК, по сравнению с его внеклеточным пулом [Шуба М.Ф., Бурый В.А., 1984]. В присутствии ингибитора  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы СПР тапсигаргина значительно ослаблялось активирующее действие НП на сокращения ГМК мочеточника, но не на длительность ПД.

Эти данные можно рассматривать как свидетельство того, что природа активации сокращения ГМК мочеточника частично обусловлена стимуляцией НП кальциевого насоса СПР. Повышенная предзагрузка ретикулума  $\text{Ca}^{2+}$  повышает значимость этой фракции в обеспечении сокращений гладких мышц мочеточника и величины кальций-зависимой компоненты калиевой проводимости мембраны ГМК.

Из-за снижения роли  $\text{Ca}^{2+}$ , депонированного в СПР под влиянием тапсигаргина [Cheranov S., Jaggar J., 2002; Yashiro Y., Duling B.R., 2003], плато ПД ГМК мочеточника удлиняется в связи с уменьшением кальций-активируемой компоненты калиевой проводимости мембраны, и, соответственно, снижается влияние НП на ПД.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что действие цГМФ – вторичного посредника NO на сократительную активность ГМК мочеточника противоположно эффектам цАМФ. По-видимому, конечный эффект изменения внутриклеточного содержания циклического нуклеотида определяется соотношением концентраций цАМФ/цГМФ. В физиологических условиях их внутриклеточный баланс дос-

таточно успешно поддерживается набором изоформ ФДЭ циклических нуклеотидов.

Вероятно, при высоких концентрациях цАМФ происходит накопление внутри ГМК мочеточника и цГМФ, что отражается соответствующим изменением их сократительных реакций, характерным уже для этого циклического нуклеотида. Данные, полученные при избирательном увеличении цАМФ или цГМФ их проникающими аналогами, позволяют говорить о возможности их независимого и разнонаправленного действия на сопряжение возбуждения-сокращения в ГМК мочеточника при определенных концентрационных соотношениях в клетке. При этом цАМФ снижает длительность плато ПД и угнетает сокращение ГМК за счет активации калиевой проводимости мембраны, а цГМФ усиливает сокращения за счет увеличения натриевой проводимости мембраны и вклада ретикулярного  $Ca^{2+}$  в генерацию сокращений изучаемой гладкой мышцы.

Проведенные исследования указывают на особую роль С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы в механизмах действия NO на сократительные свойства ГМК. Известно, что в условиях стимуляции этого пути агонистами  $\alpha_1$ -адреноэргических и  $H_1$ -гистаминэргических рецепторов наряду с рецептор-управляемым входом ионов  $Ca^{2+}$  в ГМК обеспечивается оперированием обеих ветвей кальциевой сигнальной системы: кальмодулин-зависимой и С-киназной. [Rasmussen H., 1982; Berridge M., 1984; Lee M., Severson D., 1994; Somlyo A.P., Somlyo A.V., 1994].

Угнетающий эффект НП может быть связан с подавлением рецептор-управляемого входа ионов кальция. Однако, использование селективного ингибитора ПК-С кальфостина С показало, что проявление угнетающего влияния НП на индуцированные БАВ сокращения ГМК связано, в первую очередь, с подавлением активности С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы.

В ГМК мочеточника и *taenia coli* С-киназная система регуляции электрической и сократительной активности использует эффекторные механизмы, отличные от тех, которые оперируют в других ГМК [М.Б. Баскаков с соавт. 1987-1988]. Включение этого внутриклеточного пути передачи сигналов ведет к угнетению электрической и сократительной активности за счет увеличения калиевой проводимости мембраны вследствие стимуляции натрий-протонного обмена. Если НП снижает индуцированную БАВ активность ПК-С, то в отсутствие ее значимой стимуляции (вызванные электрическим током ПД и сокращение ГМК мочеточника) может высвободить электрическую и сократительную активность гладкой мышцы от тормозящего влияния последней. Этот механизм, наряду с активацией натриевой проводимости мембраны и увеличением предзагрузки кальцием СПР, обеспечивает стимуляцию оксидом азота сократительной активности ГМК мочеточника.

Есть основания полагать, что важную роль в патогенезе таких патологических процессов, как бронхиальная астма, гипертоническая болезнь, дискинезии органов ЖКТ и т.д. [Капилевич Л.В. с соав., 2001; Поленов М.А., 1998; Ignarro L., e.a., 1999; Ekerhovd E., e.a., 1999; Denninger J., Marletta M., 1999; Shibata C., e.a., 1998; Vanhoutte P., 1998] играют нарушения синтеза и/или эффекторных механизмов сигнального пути, опосредованного NO. Возможно, ключевую роль в их коррекции будут играть воздействия, направленные на восстановление нормальной продукции NO и/или взаимодействий цГМФ с основными внутриклеточными сигнальными системами ГМК.

## **ВЫВОДЫ**

1. Нитропруссид натрия и нитроглицерин вызывают различные по степени выраженности и направленности миотропные эффекты в гладких мышцах в зависимости от объекта исследования, вида предсокращающего агента, концентрации используе-

мого нитросоединения и активности гуанилатциклазы. Нитропруссид натрия вызывает активацию цГМФ-зависимых процессов в ГМК, тогда как угнетающее электрическую и сократительную активность действие нитроглицерина обусловлено и цГМФ-независимым подавлением кальциевой проводимости мембраны ГМК.

2. Потенциал-зависимые механизмы действия нитропруссид натрия, обусловленные активацией натриевой и модулирующим влиянием на кальций-зависимые компоненты калиевой и хлорной проводимостей мембраны, наряду с мобилизацией  $\text{Ca}^{2+}$  из СПР, способствуют увеличению длительности плато ПД и амплитуды сокращений ГМК мочеточника морской свинки

3. В условиях активации С-киназной ветви кальциевой регуляции биологически активными веществами гистамином и мезатоном нитропруссид натрия вызывает подавление электрической и сократительной активности ГМК мочеточника морской свинки за счет непосредственного угнетения протеинкиназы-С.

4. Концентрационные соотношения циклических нуклеотидов определяют отличия миотропных эффектов, которые обусловлены избирательной способностью к влиянию на ионную проводимость мембраны ГМК и увеличению предзагрузки  $\text{Ca}^{2+}$  СПР.

5. Нитропруссид натрия влияет на сократительную активность ГМК мочеточника за счет модуляции активности натрий-протонного обмена и опосредованной  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  - котранспортом кальций-зависимой хлорной проводимости мембраны.

#### СПИСОК ОСНОВНЫХ ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Исследование роли внутриклеточного пула  $\text{Ca}^{2+}$  в релаксирующем эффекте нитропруссид натрия в гладкомышечных клетках аорты крысы. // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 1999, т.127, №2. С.177-179. (Соавт. Ковалев И.В., Капилевич Л.В., Баскаков М.Б. и др.)

2. Релаксирующий эффект нитропруссид натрия в гладких мышцах: роль ионов кальция. // Сб. статей «Актуальные проблемы пульмонологии» - Москва, 2000 г., с.722-729. (Соавт. Ковалев И.В., Панов А.А., Капилевич Л.В. и др.)

3. Влияние нитросоединений на электромеханическое сопряжение гладкомышечных клеток мочеточника // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 2000, т.129.-№5. С.539-541. (Соавт. Ковалев И.В., Панов А.А., Бородин Ю.Л. и др.)

4. Исследование механизмов NO-зависимого расслабления гладких мышц аорты крысы с помощью нитросоединений // Экспериментальная и клиническая фармакология.- 2001, т.64, №3, С.33-36. (Соавт. Ковалев И.В., Панов А.А., Бородин Ю.Л. и др.)

5. Влияние ингибиторов фосфодиэстераз циклических нуклеотидов на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 2002, т.133.-№1. С.47-50. (Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Миноченко И.Л. и др.)

6. Electrical and contractile function of vascular smooth muscle cells: regulation by cGMP-dependent mechanisms (The 13th European Meeting on Hypertension, June 13–17, 2003. Milan, Italy) // Journal of Hypertension 2003. Vol. 21 (suppl 4), P1.295, S101. (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Капилевич Л.В. и др.)

7. Влияние буметанида, ингибитора  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспорта, на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 2003, т. 136.-№8. С.167-172 (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Анфиногенова Я.Д. и др.)

8. Исследование цГМФ-зависимых механизмов действия винпоцетина на гладкомышечные клетки // Экспериментальная и клиническая фармакология.- 2003, т.66, №4, С.25-28. (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Килин А.А. и др.)

9. Миогенные эффекты циклического гуанозинмонофосфата в гладкомышечных клетках. Роль протеинкиназы С. // Росс. Физ. журнал им. И.М.Сеченова –2003,-т.89,-№4, С.436 – 446 (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А. и др.)

10. NO-зависимые механизмы регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц. // Росс. Физиол. ж. им. Сеченова.-2004,-т.90, -№8, С.375. (Соавт. Ковалев И.В., Баскаков М. Б., Медведев М. А. и др.)

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СГМУ

Заказ № 347

Тираж 100 экземпляров