

Роль оксида азота в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц

Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Капилевич Л.В., Медведев М.А.

Role of nitric oxide in the regulation of electrical and contractive activity of unstripped muscles

Kovalyov I.V., Baskakov M.B., Kapilevich L.V., Medvedev M.A.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Капилевич Л.В., Медведев М.А.

Цель исследования — выяснение механизмов, используемых биологическими системами с участием оксида азота NO в физиологических процессах и патофизиологических реакциях.

Установлена относительная роль электро- и фармакомеханического сопряжения гладкомышечных клеток (ГМК) в механизмах действия оксида азота. Показано, что активация входа ионов кальция биологически активными веществами усиливала релаксирующий эффект NO и опосредована потенциал-зависимыми и потенциал-независимыми внутриклеточными механизмами перераспределения ионов кальция, относительный вклад которых обуславливал направленность изменений электрогенеза и сокращений в данном конкретном типе гладкой мышцы.

Обнаружено, что потенциал-зависимые эффекты оксида азота связаны с угнетением кальциевой и/или натриевой и модуляцией кальций-зависимой и АТФ-чувствительной компонент калиевой проводимости мембраны ГМК. Потенциал-независимый контроль NO механического напряжения гладких мышц во многом опосредован модуляцией С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы ГМК, соотношением внутриклеточных концентраций циклических нуклеотидов (цГМФ/цАМФ) и направленностью оперирования $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -котранспорта. Миогенность оксида азота определяется базальными механизмами оперирования протеинкиназы С в гладкомышечных клетках.

Ключевые слова: оксид азота, гладкомышечные клетки, внутриклеточная сигнализация.

The aim of investigation is to reveal mechanisms being used by biological systems with the participation of nitric oxide NO in physiological processes and pathophysiological responses.

The relative role of electro- and pharmacomechanical coupling of unstripped muscle cells (UMC) in mechanisms of nitric oxide action has been determined. It has been shown that activation of calcium ion input by biologically active substances had intensified NO relaxing effect. This activation has been mediated by potential-dependent and potential-insensitive intracellular mechanisms of calcium ion redistribution, the relative contribution of which had determined the direction of change in electrogenesis and contractions in the given particular type of unstripped muscle.

It has been found that the potential-dependent nitric oxide impacts were connected with the suppression of calcium and/or natrium component of potassium UMC conductivity. As well as they were connected with the modulation of calcium-dependent and ATP-sensitive component of potassium UMC conductivity.

Potential-independent NO control of unstripped muscle mechanic tension has been mediated, in many respects, by the modulation of UMC calcium signal system C-kinase branch, by the ratio of cyclic nucleotides concentrations (cGMP/cAMP) and by the directional mode of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -co-transport. Myogenic effects of nitric oxide are determined by basal operation of protein kinase C in unstripped muscle cells.

Key words: nitric oxide, unstripped muscle cells, intracellular signalling.

УДК 616.73:546.17:612.741

Введение

Концентрация, а в большей мере ее изменение, свободных ионов кальция Ca^{2+} в цитоплазме гладкомышечных клеток (ГМК) играет главенствующую роль в цикле сокращения — расслабления [4, 23, 30, 39, 40, 48, 59, 88, 93, 94, 118, 126, 127, 143]. Общеизвестно, что данный процесс контролируется многочисленными гормонами, медиаторами и другими физиологически (ФАВ) и биологически активными веществами (БАВ), которые реализуют свое влияние на ГМК через систему внутриклеточных вторичных посредников-мессенджеров [3—7, 10—12, 19, 22, 35, 36, 93, 105, 107, 115, 125—129, 141, 143].

Особое положение среди ФАВ, влияющих на состояние ГМК, занимает оксид азота NO, миогенные функции которого стали отождествлять с эндотелий- и эпителий-релаксирующим фактором (ЭРФ) сосудов и воздухоносных путей [5, 10—12, 24, 27, 36, 49, 50, 54, 65, 88, 101]. Именно ЭРФ, несмотря на то, что природа и механизмы действия его продолжают интенсивно изучаться, в настоящее время большинством исследователей идентифицируется с оксидом азота, продуктом NO-синтазы (NOS) [5, 10—12, 25, 27, 29, 31, 32, 54, 65, 73, 81, 82, 101, 102, 134, 136]. Важная роль NO в обеспечении межклеточной и внутриклеточной сигнализации уже получила множество подтверждений экспериментального характера, а R. Furchgott, L. Ignarro и F. Murad, открывшие сигнальные функции оксида азота, были удостоены в 1998 г. Нобелевской премии.

В настоящее время обнаружена экспрессия генов NOS не только в эндотелии сосудов и эпителии воздухоносных путей, но и в различных мышечных и немышечных структурах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [27, 47, 100] и матки [55, 75, 139]. Оказалось, что оксид азота способствует нормальному процессу имплантации яйцеклетки, и его концентрация в тканях миометрия достигает максимального значения непосредственно перед родами [75, 139].

Ряд полученных данных свидетельствует о том, что NO в качестве первичного посредника может обеспечивать не только локальную, но и дистантную регуляцию гладкомышечных органов, являясь нейро-трансммиттером в некоторых центральных и периферических синапсах [27, 29, 77,

128]. Было показано, что в органах ЖКТ и репродуктивной системы стимуляция нитроксидергической иннервации угнетает спонтанную активность ГМК тонкого кишечника, матки и фаллопиевых труб [29, 54, 139].

Кроме сигнальных, NO выполняет цитопро-текторные и цитотоксические функции [24, 25, 27, 29, 136]. Уже накоплено большое количество данных об участии NO в развитии патологических процессов и, в частности, бронхиальной астмы и гипертонической болезни [5, 10—12, 82, 135, 136]. Такое сочетание деструктивных и защитных эффектов позволяет считать эту молекулу одной из центральных фигур поддержания баланса физиологических и патофизиологических процессов во многих тканях.

Общая феноменология влияния оксида азота и его доноров, нитросоединений, на сократительную функцию ГМК достаточно хорошо известна. Во всех исследованных типах гладких мышц они уменьшали механическое напряжение, угнетали спонтанную активность и снижали величину сократительных ответов на действие ФАВ и БАВ [5, 10—12, 14—21, 28, 35, 36, 44, 62, 65, 69, 96—100, 136, 138—142].

Гораздо менее полно исследовано действие оксида азота на электрические свойства ГМК, и практически отсутствуют сведения о его влиянии на сопряжение возбуждения — сокращения в гладких мышцах. Имеются данные о действии на потенциал-зависимую, кальций-активируемую и АТФ-чувствительную компоненты калиевой проводимости мембраны ГМК [5, 8, 10—21, 51, 79, 89, 100, 122, 142], но вклад каждой из них в изменения электрогенеза до сих пор не ясен. Малоизученными остаются механизмы влияния NO на эффективность оперирования основных внутриклеточных сигнальных систем гладких мышц: кальмодулин-зависимой и С-киназной ветвей кальциевой и опосредованной циклическим аденозинмофосфатом (цАМФ). В этой связи возникает необходимость изучения основных закономерностей и особенностей реализации сигнальной функции NO в различных типах гладких мышц.

Основная внутриклеточная мишень оксида азота — растворимая гуанилатциклаза

В гладкомышечных клетках, как и в большинстве других, эффекты оксида азота обусловлены активацией цитозольного фермента — растворимой фракции гуанилатциклазы (ГЦ), которая в присутствии ионов Mg^{2+} или Mn^{2+} преобразует гуанозинтрифосфат (ГТФ) в циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) [25, 31, 32, 34, 69]. Эта форма ГЦ представляет собой гем-содержащий гетеродимер, состоящий из двух субъединиц: большой — α (α_1 или α_2 , ММ = 80 кД) и малой — β (β_1 или β_2 , ММ = 72 кД). Несмотря на то, что каждая из субъединиц фермента обладает каталитическим доменом, только в виде димера (α_1/β_1 или α_2/β_1) ГЦ обладает каталитической активностью и чувствительностью к нитросоединениям [31, 34, 69]. Связь гема с белковой молекулой ГЦ достаточно неустойчива и может нарушаться при понижении рН или некоторых способах очистки и выделения фермента [31, 34, 69], что может приводить к нарушению ее экзо- и эндогенной регуляции как эндогенным оксидом азота, так и нитросоединениями, образующими свободно-радикальную группу NO и полувыведенными по этой причине статус доноров [5, 10—21, 25, 31, 34, 73, 81, 82].

Эффект доноров NO обусловлен отщеплением от них содержащей азот группы (денитрацией) в результате деятельности ферментов при метаболизме органических нитратов, например нитроглицерина [11, 32, 131], либо спонтанно, как в случае с неорганическим нитратом — нитропруссидом натрия. Известно, что последний содержит оксид азота в виде катиона нитрозония ($Na_2[FeNO^+(CN)_5]$), который взаимодействует с Fe^{2+} гема и образует комплекс нитрозил-гем, являющийся истинным активатором ГЦ в результате конформационного отведения ионов железа из порфиринового кольца [24]. Именно оно, пространственно лишенное Fe^{2+} , воспроизводит структуру сильнейшего активатора растворимой фракции гуанилатциклазы, протопорфирина IX. Такая способность активировать ГЦ за счет спонтанного вы-

свобождения оксида азота оставляет нитропруссид натрия в ряду наиболее часто используемых нитросоединений для изучения NO-зависимых реакций [5, 10—21, 31, 32, 34, 64, 65, 69, 142].

В роли ингибиторов растворимой фракции ГЦ чаще всего используют метиленовый синий; 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ); (phenylamino)-5,8-quinolinedione (LY 83583). Считается, что если при их применении угнетается исследуемый процесс, можно предположить его цГМФ-зависимые механизмы развития [5, 10—12, 14—21, 25, 31, 32, 34, 69, 77, 89, 142].

Таким образом, NO либо его доноры, активируя ГЦ и используя в качестве вторичного посредника цГМФ, с помощью соответствующих протеинкиназ (ПК-G) могут осуществлять фосфорилирующее активирование либо дезактивирование целого ряда внутриклеточных процессов на уровне эффекторных систем. ПК-G, играя роль системного антагониста метаболизма Ca^{2+} , могут влиять на уровень электрической и сократительной активности ГМК [4, 5, 10—12, 14—21, 31, 85, 96, 97, 132, 139, 140].

Хотя представленная точка зрения общепринята, сомнения в необходимости самостоятельного оперирования цГМФ/ПК-G в качестве внутриклеточной сигнальной системы остаются. В первую очередь они могут быть обусловлены взаимодействием NO с другими сигнальными системами и/или системами, хотя и не имеющими общепринятый статус таковых, но претендующими на него в ближайшем будущем.

Например, появились сведения о влиянии оксида азота на активность тирозиновых-, Rho- и MAP-киназ [52, 53, 59—62, 123], однако еще не получено однозначного ответа об их роли в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц. Обращает на себя внимание обязательность участия С-киназной ветви (ПК-С) кальциевой сигнальной системы в процессе их инициации [7, 52, 53, 59—62, 66, 67, 83, 102, 103, 118, 121, 123, 134, 144].

Все вышеперечисленное заставило нас провести сравнительные исследования цГМФ-зависимых механизмов влияния оксида азота на электрические и сократительные свойства гладких мышц, исходно отличающихся целым комплексом

электрофизиологических характеристик, обусловленных, по-видимому, особенностями оперирования их сигнальных систем [3, 4, 7, 11, 12, 19].

Не изменяя исходное механическое напряжение (МН) и мембранный потенциал (МП), доноры оксида азота нитропруссид натрия (НП) и нитроглицерин (НГ) дозо-зависимым способом в диапазоне концентраций 0,1—1000 мкМ реполяризовали мембрану и расслабляли деполяризованные и предсокращенные 40 мМ гиперкалиевым раствором ГМК аорты крысы [14, 17], мочеточника и *taenia coli* морской свинки [19]. Если использовать в качестве сравнительного критерия полумаксимальный расслабляющий эффект (EC_{50}) НП и НГ, то из исследуемых ГМК можно сформировать ряд: аорта > *taenia coli* > мочеточник.

Если концентрации и характер релаксирующего эффекта нитросоединений незначительно отличались от таковых в других гладких мышцах, варьируя в диапазонах чувствительности сосудов, воздухоносных путей, миометрия, мочевого пузыря и ЖКТ [5, 10—12, 14—17, 21, 28, 54, 65, 79, 81, 82, 87—89], то реполяризуя мембрану исследуемых нами ГМК полумаксимальный эффект НГ и НП проявлялся при более высоких концентрациях, чем релаксирующий [14, 17, 19].

Кроме того, НГ вызывал реполяризацию мембраны и расслабление исследуемых ГМК при более низких концентрациях и быстрее, чем НП [14, 15, 17]. Однако эти эффекты сопровождались выраженным развитием толерантности [9, 27, 131], что осложняло его использование в качестве тестирующего агента.

Природа толерантности нитроглицерина до сих пор не выяснена, а отличия фармакокинетических характеристик, вероятнее всего, обусловлены его структурой, предполагающей более высокую липофильность и, следовательно, мембранотропность, а также его особенностями метаболизма, связанного с усиленным образованием нитрозотиолов — сильных активаторов ГЦ [9, 27, 99, 131].

Гладкие мышцы *taenia coli* и мочеточника морской свинки отличаются от сосудов своей способностью к генерализации как спонтанных (*taenia coli*), так и вызванных электрическим деполяризующим мембрану ГМК стимулом потен-

циалов действия (ПД), сопровождающихся сокращениями [4, 23, 39, 57, 71, 93]. НП и НГ, начиная с концентрации 10 мкМ, угнетали спонтанную и вызванную электрическую и сократительную активность ГМК *taenia coli* [19]. Так как при этом величина анаэлектротонических потенциалов, полученных в ответ на гиперполяризующий стимул и свидетельствующих о сопротивлении мембраны, не изменялась, как и в случае с аортой крысы [14, 17], можно предположить отсутствие влияния нитросоединений на потенциал-зависимую калиевую проводимость мембран исследуемых нами ГМК [39].

С другой стороны, известно, что спонтанные и вызванные электрическим стимулом ПД ГМК *taenia coli* морской свинки имеют кальциевую природу [3, 4, 6, 16, 57, 71]. В отсутствие изменения сопротивления мембраны при действии нитросоединений есть основание полагать, что их угнетающие эффекты обусловлены отрицательным влиянием NO-зависимых механизмов на потенциал-зависимую кальциевую проводимость мембраны подобно действию цГМФ (ПК-G) на кальциевые L-токи изолированных сосудистых ГМК [98, 127, 129, 141].

Потенциал действия ГМК мочеточника, который имеет более сложную (натрий-кальций-калиевую) ионную природу [3, 16, 18—21, 23, 39], в присутствии нитросоединений изменялся иначе. Если при действии НГ (1—500 мкМ) ПД, как и сокращения, угнетались при нарастании концентрации, то НП (до 1 мМ) либо не влиял на ПД, либо, повышая его длительность, увеличивал амплитуду сокращений [16, 19—21].

Ответ на вопрос о цГМФ-зависимом характере представленных выше эффектов нитросоединений был получен с помощью метиленового синего, ингибитора гуанилатциклазы [5, 10—12, 14—21, 29, 31, 69, 77, 89], который, не влияя на исходный уровень МП и МН исследуемых ГМК, устранял реполяризующее и релаксирующее (либо активирующее) действие НП [5, 10—12, 14—21].

Нитроглицерин, в отличие от нитропруссида натрия, продолжал угнетать ПД и сокращения ГМК мочеточника и в присутствии метиленового

синего способом, характерным для его действия в отсутствие ингибитора ГЦ [16, 19].

Полученные данные указывают на то, что основной мишенью для нитропруссид натрия, как и оксида азота, в исследуемых ГМК является растворимая фракция гуанилатциклазы, поскольку его эффекты полностью устранялись метиленовым синим, тогда как влияние нитроглицерина на ПД и сокращения ГМК мочеточника осуществляется и цГМФ-независимым способом.

Влияние оксида азота на рецептор-опосредованную регуляцию гладких мышц

В соответствии с классической схемой возбуждающее действие агонистов рецепторов (БАВ) на ГМК обусловлено открыванием малоселективных рецептор-управляемых ионных каналов и, последовательно, селективных кальциевых рецептор-управляемых ионных каналов, которое ведет к деполяризации мембраны, открыванию потенциал-зависимых кальциевых каналов и освобождению ионов Ca^{2+} из внутриклеточного депо [4, 25, 40, 93]. В последнее время в эту схему в качестве важного компонента включена протеинкиназа С (ПК-С), активация которой обусловлена входом ионов Ca^{2+} в результате воздействия БАВ на рецепторы мембраны ГМК (α_1 , H_1 , M_1 и др.), стимуляцией G-белков и фосфолипазы С [4, 19, 30, 35, 36, 39, 41, 44, 46, 66, 91—94, 101, 104, 117, 118, 124, 125].

Для исследования влияния оксида азота на изменения МП и МН на ГМК аорты, вызванные стимуляцией α_1 -адренергических рецепторов, применяли фенилэфрин (ФЭ) и норадреналин (НА) в присутствии 1 мкМ β -адреноблокатора пропранолола как в качестве самостоятельного предсокращающего фактора, так и совместно с гиперкалиевыми растворами [14, 17, 21].

Особенностью зависимых от концентрации релаксирующих эффектов нитросоединений (НГ и НП) было следующее. Во-первых, в концентрации, равной EC_{50} , на предсокращенных гиперкалиевым раствором вызывали полное расслабление ГМК аорты, активированных ФЭ и НА [14, 17, 21]. Во-вторых, расслабляющий эффект НП прояв-

лялся при более низких концентрациях, чем НГ, тогда как в гиперкалиевых растворах это соотношение было обратным. Совместное применение 1 мкМ НП и НГ вызывало полное расслабление ГМК аорты, предсокращенных норадреналином [21].

При совместном использовании 40 мМ хлорида калия и 1 мкМ ФЭ в качестве предсокращающего фактора реполяризующее мембрану ГМК аорты действие НП не отличалось от тех, которые наблюдали при добавлении НП в раствор, содержащий только ФЭ или KCl, тогда как релаксирующий эффект донора оксида азота при этом варианте предсокращения (ФЭ + KCl) был достоверно меньше, чем в присутствии только фенилэфрина [14, 17]. Следовательно, при одинаковых реполяризующих эффектах НП проявлял более сильное релаксирующее действие на фенилэфрин-индуцированное, чем на индуцированное деполяризацией мембраны сокращение ГМК аорты, что отмечалось и для других сосудистых ГМК [65].

Полученные данные позволяют считать, что при действии α_1 -адреномиметиков сокращение ГМК обеспечивается процессами, которые проявляют большую чувствительность к оксиду азота. Усиление расслабляющего действия нитросоединений на ГМК, предсокращенные БАВ, может быть обусловлено влиянием последних на последовательные этапы запуска и поддержания сокращения гладких мышц возбуждающими агонистами: на рецептор-управляемые ионные каналы, потенциал-зависимый вход ионов кальция в ГМК и (или) на активируемые при этом процессы, не зависящие от изменения МП.

Для изучения рецептор-управляемого входа ионов кальция фенилэфрин добавлялся на фоне действия раствора, содержащего 120 мМ хлорида калия, так как считается, что прирост МН в ответ на действие ФЭ в этих условиях обеспечивается исключительно открыванием рецептор-управляемых кальциевых каналов [4]. Так как вызванное ФЭ на фоне 120 мМ KCl повышение МН при том же МП было не чувствительно и к 1 мМ НП [17], можно считать, что расслабляющее влияние NO на предсокращенные ФЭ ГМК аорты не связано, в противоположность известному

мнению [40, 88], с угнетением рецептор-управляемого входа в эти клетки ионов Ca^{2+} .

В последние десятилетия убедительно показано, что, кроме рецептор-управляемого входа в ГМК ионов Ca^{2+} , α_1 -адреномиметики включают сигнальный путь, опосредованный активацией метаболизма мембранных фосфоинозитидов, который и обеспечивает генерацию гладкой мышцей поддерживаемого сокращения [4, 30, 35, 36, 93, 94, 104, 105, 108, 109, 126]. По-видимому, в условиях перегрузки цитозоля ионами кальция оксид азота не влияет на сигнальный каскад, связанный с гидролизом мембранных фосфоинозитидов.

Для сравнения изучалось влияние NO на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника на фоне БАВ. Оказалось, что присутствие гистамина и фенилэфрина, усиливающее электрическую (удлинение ПД) и сократительную (рост амплитуды) активность ГМК мочеточника, приводит к инвертированию эффекта НП: вместо активирующего сокращения [16] он становится угнетающим [18, 19].

Эти данные подтверждают, что в ГМК мочеточника, как и в аорте, оксид азота более эффективно действует на изменения электрогенеза и сокращения ГМК, индуцированные БАВ, чем на исходную активность или на изменения, вызванные деполяризацией мембраны хлоридом калия или электрическим стимулом.

Таким образом, дополнительная деполяризация мембраны ГМК и, следовательно, повышение входящего потока Ca^{2+} ослабляли реализацию эффектов NO, тогда как активация рецепторов, сопряженных с метаболизмом фосфоинозитидов, усиливала эти процессы. Если в последнем случае происходит активация обеих ветвей кальциевой сигнальной системы (кальмодулин-зависимой и С-киназной), то более выраженное влияние НП на индуцированное БАВ сокращение, чем на вызванное хлоридом калия, свидетельствует о том, что угнетение С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы играет существенную роль в механизмах NO-зависимого расслабления. Это предположение согласуется с данными о том, что

цГМФ может угнетать метаболизм мембранных фосфоинозитидов [31, 35, 63, 69, 70, 78, 108, 109, 125, 130].

Существование столь чувствительного к действию NO сигнального пути потребовало его изоляции от таких известных способов реализации релаксирующих механизмов, как активация калиевой проницаемости мембраны ГМК [8, 10—21, 51, 79, 89, 100, 122, 142]. Поэтому была исследована роль изменений калиевой проводимости мембраны в механизмах действия NO на активированные БАВ ГМК аорты [17].

Оказалось, что на фоне совместного использования блокатора калиевой проводимости мембраны тетраэтиламмония (ТЭА) [3, 4, 6, 23, 39, 40] и ФЭ именно релаксирующий, но не реполяризирующий эффект EC_{50} НП достигал уровня, близкого к 50%.

Поскольку присутствие в растворе ТЭА в большой степени ослабляло реполяризирующее и расслабляющее действие оксида азота на предсокращенные хлоридом калия гладкомышечные полоски, то такие особенности реагирования гладких мышц аорты могут быть обусловлены различиями в природе контрактур, вызванных хлоридом калия и ФЭ. Если гиперкалиевая контрактура обеспечивается притоком кальция извне по неактивирующимся кальциевым каналам плазмалеммы, то поддерживаемое сокращение при действии ФЭ обеспечивается оперированием С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы. В первом случае реполяризация и снижение МН могут быть достигнуты за счет угнетения кальциевой или (и) активации калиевой проводимостей мембраны ГМК. Во втором — действие соединений, оказывающих реполяризирующее и расслабляющее действие, должно быть направлено на протеинкиназу С или на процессы, индуцируемые активацией этого фермента.

По-видимому, резкое ослабление такого действия НП в гиперкалиевом ТЭА-содержащем растворе может служить свидетельством вовлечения калиевой проводимости мембраны в механизмы действия оксида азота на контрактуру гладких мышц аорты, вызванную деполяризацией мембраны. Если сокращение этих ГМК вызвано стимуляцией рецепторов, которые активируют

метаболизм мембранных фосфоинозитидов, сохранение обычного влияния НП на МП и МН указывает на то, что НП реализует свое действие через С-киназный путь передачи внутриклеточного сигнала.

Возникает вопрос, по какой причине в ГМК мочеточника оксид азота вызывает реакции, противоположные тем, которые развиваются в ГМК аорты?

Нашими исследованиями [3, 4, 6] уже было показано, что в ГМК мочеточника С-киназная система регуляции электрической и сократительной активности использует эффекторные механизмы, отличные от тех, которые оперируют в сосудах. Включение этого пути передачи внутриклеточных сигналов ведет к угнетению электрической и сократительной активности за счет увеличения калиевой проводимости мембраны вследствие стимуляции Na^+/H^+ -обмена.

Взаимодействие оксида азота с внутриклеточными сигнальными системами

Так как в настоящее время трудно представить себе более значимые для гладких мышц сигнальные системы, чем кальциевый и цАМФ-опосредованный пути, взаимоотношение которых опосредует уровень сократительной и электрической активности ГМК, то именно они были выбраны в качестве вероятных внутриклеточных регуляторных мишеней оксида азота.

Кальциевая сигнальная система

Источниками ионов кальция, необходимых для активации и поддержания сокращения гладких мышц, являются внеклеточное пространство и внутриклеточные депо, которые опустошаются в момент развития деполяризации мембраны при действии электрического стимула или БАВ (электро- и фармакомеханическое сопряжение соответственно) [4, 23, 30, 39, 40, 88, 93, 94, 118, 126, 127].

Для активации потенциал-зависимого входа ионов Ca^{2+} через деполяризованную мембрану проводилось предсокращение ГМК аорты крысы растворами с концентрацией КСI 40, 60 и 120 мМ.

Дополнительное увеличение МП и МН оставляло реполяризующее и релаксирующее влияние нитропруссид натрия на ГМК на одном уровне, но удаляло его при 120 мМ КСI [14, 17].

Более детальное изучение потенциал-зависимых механизмов действия NO продолжали эксперименты с использованием блокаторов кальциевых каналов и модифицирующих содержание внеклеточных ионов Ca^{2+} -растворов [15].

Применение 10 мкМ блокатора потенциал-зависимых кальциевых каналов верапамила [4, 15, 39, 88] расслабляло наполовину и на треть реполяризовало мембрану ГМК аорты крысы, предсокращенных и деполяризованных 40 мМ гиперкалиевым раствором. Добавление на фоне верапамила 10 мкМ НП приводило к полному расслаблению и дополнительной реполяризации мембраны ГМК. Подобный эффект оказывает и верапамил на фоне действия НП, полностью расслабляя ГМК и снижая их МП вдвое от контрольных значений [15].

Следовательно, ограничение входящего потока ионов Ca^{2+} верапамилем ослабляло реполяризующие и усиливало релаксирующие эффекты НП на ГМК аорты. По-видимому, действие NO обусловлено не только угнетающим влиянием на входящие по потенциал-зависимым кальциевым каналам ионы Ca^{2+} , но и значительным участием потенциал-нечувствительных механизмов расслабления ГМК, проявляющихся на фоне действия блокатора потенциал-зависимых кальциевых каналов верапамила.

Помещение ГМК аорты в бескальциевые растворы Кребса, содержащие 1 мМ ЭГТА, приводило к снижению вдвое МН и развитию деполяризации мембраны ГМК на треть от контрольных значений в 40 мМ растворе хлорида калия. В бескальциевом, содержащем ЭГТА, растворе влияние хлорида калия на МП и МН ослабевало более чем вдвое и имело транзитный характер [15]. Тем не менее развитие МН в бескальциевых растворах указывало на сохранность в этих условиях внутриклеточного пула ионов Ca^{2+} , инициирующего сокращения. Применение 10 мкМ НП полностью устраняло эти сократительные ответы ГМК аорты крысы, не влияя на уровень МП.

Использование бескальциевых ЭГТА-содержащих растворов позволяет снижать вне- и,

опосредованно, внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} , о чем свидетельствует падение МН. Деполяризация мембраны ГМК при этом могла быть связана с увеличением проницаемости мембраны для ионов натрия и уменьшением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Последнее ведет к уменьшению или полному устранению значимой для поддержания потенциала покоя сосудистых ГМК Ca^{2+} -зависимой калиевой проводимости мембраны ГМК [39, 40, 83]. Поскольку многие авторы называют ее в качестве возможной мишени для NO [9, 48, 51, 93, 96, 117, 122, 139], вероятно, что реполяризация мембраны ГМК при действии НП в гиперкалиевом растворе может быть связана с изменениями Ca^{2+} -зависимой компоненты калиевой проводимости.

Вместе с тем отсутствие реполяризующего эффекта НП в бескальциевом ЭГТА-содержащем гиперкалиевом растворе может быть отчасти связано и с тем, что в данных экспериментальных условиях резко уменьшается сопротивление мембраны, поэтому даже существенные сдвиги в величине калиевых токов, если они и имели место, не могли привести к заметным изменениям МП.

Для выделения кальциевой (пиковой) компоненты ПД ГМК мочеточника, обусловленной в обычных условиях изменениями проводимости мембраны к ионам Ca^{2+} , Na^+ и K^+ , наружные ионы натрия замещались холинхлоридом [23]. В безнатриевом растворе НП (100 мкМ) подавлял пиковый ПД и сокращения [16, 23]. Такие изменения ПД и, как следствие, сокращений могли быть связаны с прямым угнетением потенциал-зависимой кальциевой и/или с повышением калиевой проводимости мембраны ГМК. Для выяснения этого вопроса использовали блокатор калиевых каналов ТЭА.

Добавление 5 мМ ТЭА в безнатриевый раствор привело к появлению плато ПД и усилению сокращений [16, 19, 23], которые не были чувствительны к НП. Наоборот, угнетающий эффект НП в безнатриевом, содержащем ТЭА растворе практически не отличался от его же действия в растворе Кребса [16].

Результаты исследований подтверждают способность НП угнетать проводимость кальциевых каналов L-типа ГМК мочеточника морской свинки,

а сохранность этих эффектов на фоне ингибитора ГЦ (см. ч. 1) позволяет предположить, что нитроглицерин осуществляет их с помощью цГМФ-независимых механизмов.

Полученные данные указывают и на то, что изменения ПД, вызванные добавлением НП в безнатриевый раствор, обусловлены в первую очередь нарушениями калиевой проводимости мембраны ГМК, что заставило нас с помощью блокаторов калиевых каналов ТЭА и глибенкламида [14, 23, 39, 40, 58, 109] детально исследовать влияние NO на одну из важнейших составляющих электрогенеза ГМК [39, 40, 93, 111].

В ГМК аорты, предсокращенных гиперкалиевым (40 мМ) раствором, добавление 5 мМ ТЭА, вызывающее дополнительную деполяризацию мембраны и рост МН, существенно ослабляло действие 10—1000 мкМ нитропруссид натрия [14, 17]. Например, если в отсутствие ТЭА добавление 1 мМ НП практически полностью расслабляло ГМК, то на фоне блокатора калиевых каналов релаксирующий эффект нитросоединения едва превышал 50%. Повышение концентрации тетраэтиламмония до 10 мМ приводило к ослаблению релаксирующего и реполяризующего мембрану ГМК эффекта НП еще в большей степени. Таким образом, на фоне угнетения калиевой проводимости мембраны ГМК ТЭА резко снижалась эффективность реполяризующего и расслабляющего действия НП.

Известно, что в указанных концентрациях ТЭА уменьшает потенциал-зависимую и кальций-активируемую калиевые проводимости мембраны ГМК [4, 23, 58, 109]. Как указывалось выше, нитропруссид натрия не изменял вольт-амперную характеристику мембраны ГМК аорты, а значит, не оказывал влияния на потенциал-зависимую калиевую проводимость мембраны ГМК аорты. Следовательно, резкое ослабление тетраэтиламмонием реполяризующих эффектов НП связано с блокированием Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов мембраны ГМК аорты, и тем самым уменьшение МП при действии НП обусловлено повышением Ca^{2+} -активируемой калиевой проводимости мембраны.

В ГМК мочеточника добавление 5 мМ ТЭА в раствор Кребса вызывало двукратное увеличение

длительности плато ПД и наполовину — амплитуды сокращений ГМК мочеточника. В таких условиях эффекты 100 мкМ НП и НГ отличались существенно: если нитропруссид натрия дополнительно увеличивал амплитуду, длительность плато ПД и силу сокращений, то нитроглицерин сохранял свое угнетающее влияние на электрическую и сократительную активность ГМК [16, 19].

Блокатор АТФ-чувствительных калиевых каналов глибенкламид (500 мкМ) в меньшей степени, чем ТЭА, но ослаблял, особенно реполяризирующий мембрану ГМК аорты, эффект НП. С другой стороны, в присутствии этого блокатора калиевой проводимости мембраны изменений ПД и сокращений ГМК мочеточника, как и влияния на них НП, не обнаружилось.

Полученные данные свидетельствуют и о том, что в ГМК мочеточника в условиях блокирования калиевых каналов оксид азота вызывал эффекты, противоположные тем, которые характерны для ГМК аорты. По-видимому, действие NO на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника в большей мере обусловлено снижением натриевой и кальциевой проводимости мембраны. Это дает основания полагать, что в ГМК сосудов и мочеточника оксид азота модулирует эффективность оперирования различных внутриклеточных сигнальных систем либо один путь передачи сигнала, эффекты активации или ингибирования которой различны в ГМК мочеточника и аорты. Наиболее реальным кандидатом на эту роль является С-киназная ветвь кальциевой сигнальной системы, особенности оперирования которой в ГМК мочеточника обнаружены достаточно давно [3, 4, 6].

Влияние оксида азота на внутриклеточные депо Ca^{2+} гладких мышц исследовалось с помощью активатора его высвобождения кофеина и ингибитора Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулула (СПР) тапсигаргина [74, 143].

Вызванный кофеином (0,6 мМ) в бескальциевых, ЭГТА-содержащих растворах прирост МН оставался без изменений и после предварительной обработки ГМК аорты крысы НП [15]. Эти данные свидетельствуют о том, что НП не оказывает влияния на процессы высвобождения ионов

Ca^{2+} из кофеин-чувствительных внутриклеточных депо ГМК.

Наоборот, на фоне предварительной обработки ГМК ингибитором Ca^{2+} -АТФазы СПР тапсигаргином (1 мкМ), вызывающим увеличение длительности плато ПД и усиление сокращений, ослаблялось активирующее действие НП на ГМК мочеточника.

Так как известно, что внутриклеточные депо Ca^{2+} не играют столь значимой для сокращения ГМК мочеточника роли, которую выполняет его внеклеточный пул [39, 40], то повышение сократительной активности тапсигаргином могло быть связано с увеличением внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция вследствие угнетения процессов их депонирования в СПР. В этом случае ослабление активирующего сокращения ГМК мочеточника действия НП в присутствии ингибитора Ca^{2+} -АТФазы СПР можно рассматривать как свидетельство того, что в активации сократительного ответа ГМК мочеточника при действии НП участвует и Ca^{2+} , депонированный в СПР, количество которого возрастает вследствие стимуляции нитропруссидом натрия кальциевого насоса СПР. Данные об активации цГМФ (ПК-G) Ca^{2+} -АТФазы СПР достаточно широко представлены в литературе [31, 34—36, 96—98, 106, 112, 123, 132].

Протеинкиназа С (ПК-С)

Для выяснения роли С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы в механизмах действия оксида азота на электрогенез и сокращения ГМК аорты и мочеточника использовался активатор ПК-С форболмиристатацетат (ФМА) и ее ингибитор кальфостин С [3, 19, 46, 63, 66, 70, 108, 109].

Как и ожидалось, активатор ПК-С форболовый эфир ФМА (0,5 и 1 мкМ) вызывал необратимым и зависимым от дозы способом угнетение амплитуды, длительности плато ПД и силы сокращений ГМК мочеточника. Этот эффект снижался предобработкой ТЭА [19]. Указанные данные подтверждали сведения о том, что механизм угнетения электрической и сократительной активности ГМК ФМА, как и другого форболового

эфира (ТФА), обусловлен увеличением калиевой проводимости мембраны [3, 4].

На фоне ФМА донор оксида азота НП вместо стимуляции сокращений ГМК мочеточника вызывал их угнетение и, более того, на фоне ФМА и НП ТЭА практически не оказывал влияния на сокращения ГМК [19]. Не исключено, что экзогенная активация форболовыми эфирами ПК-С сделала существенным угнетающее влияние на нее NO, которое в интактных условиях не проявлялось.

Ингибитор ПК-С кальфостин С (0,1 мкМ) полностью предотвращал характерную для ГМК мочеточника активацию сокращения НП и снижение сократительного эффекта при действии БАВ [19]. Последнее предпринималось для дифференцировки эффектов оксида азота, опосредованных изменениями ионной проводимости мембраны ГМК и обусловленных модуляцией С-киназного пути передачи сигнала, так как БАВ на фоне действия кальфостина С продолжали оказывать активирующее действие на ПД и сокращения ГМК мочеточника. В результате можно считать, что угнетение ПК-С кальфостин С ослабляло эффекты NO на ГМК мочеточника.

Полученные данные свидетельствуют о том, что сигнальная система, опосредованная метаболизмом фосфоинозитидов и активацией ПК-С, является одним из ключевых звеньев в реализации потенциал-независимого влияния оксида азота на сократительную активность ГМК мочеточника. Такое заключение согласуется с имеющимися литературными данными, в которых авторы сообщают об угнетении циклическим гуанозинмонофосфатом фосфолипазы С [31, 41, 63, 108, 109], одного из ключевых ферментов фосфоинозитидного обмена [4, 35, 36, 94, 108, 109]. Обнаружено снижение митогенной активности ПК-С в изолированных ГМК простаты при действии НП [78].

цАМФ-зависимая сигнальная система

Сигнальная система циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), как и соответствующая ей протеинкиназа А (ПК-А) не могла остаться вне нашего внимания по ряду причин. Во-первых, это обусловлено широким представительством эффектов цАМФ в ГМК, направленность которых в

основном известна и обсуждена в качестве антагониста кальциевой регуляции электрической и сократительной активности ГМК [4, 5, 7, 10, 11, 19, 22, 35, 36, 40, 79, 93, 98, 116, 126, 127, 129]. Во-вторых, известен факт присутствия среди фосфодиэстераз (ФДЭ) ферментов, обеспечивающих деградацию цАМФ и цГМФ, широкого спектра изоформ, отличающихся друг от друга как отсутствием селективности к циклическим нуклеотидам, так и их способностью к субстратной активации и деактивации [26, 49, 64, 84]. Приведенные аргументы заставляют предположить возможность своеобразной взаимозамены эффектов цГМФ и цАМФ.

Воспроизведение цАМФ-зависимых реакций на уровне мембранной стимуляции АЦ, например β-адреномиметиками, требует соответствующих манипуляций, совпадающих по временным характеристикам с натрийуритическими гормонами, активаторами мембранной фракции ГЦ [29, 31, 32, 92, 106]. Так как последнее вряд ли тождественно действию оксида азота, это заставило нас применить иной подход, связанный с повышением уровня цАМФ и цГМФ не за счет активации их синтеза, а за счет угнетения фермента, их расщепляющих, и дополнительно использовать проникающие аналоги циклических нуклеотидов.

Неселективный ингибитор ФДЭ 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX) [26, 84] вызывал уменьшение продолжительности плато потенциала действия и амплитуды сокращений ГМК мочеточника, которое предотвращалось присутствием блокатора калиевых каналов ТЭА [18, 19, 21]. Эти данные указывают на то, что эффекты IBMX обусловлены повышением цАМФ/цГМФ-зависимой калиевой проводимости мембраны ГМК [4, 5, 7, 9—11, 19, 22, 35, 36, 40, 48, 51, 79, 93, 96, 98, 116, 117, 122, 126, 127, 129, 139].

Винпоцетин, другой ингибитор ФДЭ 1-го типа, использующий в качестве субстрата цГМФ [26, 73, 90], оказывал противоположный IBMX эффект, увеличивая амплитуду сокращений ГМК мочеточника. Так как IBMX и на фоне винпоцетина продолжал угнетать ПД и сокращения ГМК, можно было предположить различие внутрикле-

точных мишеней, используемых этими соединениями.

С другой стороны, действие винпоцетина походило на эффекты НП [16] и, более того, их совместное применение усиливало активирующее влияние на сократительную активность ГМК мочеточника, которое полностью отменялось при предварительной обработке объекта ингибитором ГЦ метиленовым синим [18, 19, 21].

Эти данные дают основания полагать, что стимулирующее влияние винпоцетина так же, как и НП, на сокращения ГМК мочеточника обусловлено увеличением внутриклеточной концентрации цГМФ. В случае действия НП это достигается активацией растворимой фракции ГЦ, а при действии винпоцетина ингибированием процесса гидролиза цГМФ. Если это действительно так, то на фоне БАВ эффекты ингибитора ФДЭ на электрические и сократительные свойства ГМК мочеточника должны напоминать действие НП [14, 17, 19].

Действительно, на фоне фенилэфрина и особенно гистамина активация сокращения ГМК винпоцетином сменялась на противоположное: происходило угнетение сокращений и укорочение плато ПД [16, 19, 21]. То есть применение БАВ приводило к исчезновению активирующего сокращения ГМК мочеточника действия винпоцетина, как и в случае с НП. Можно предположить, что эти эффекты NO связаны с повышением уровня цГМФ в цитоплазме ГМК и развитием угнетающего влияния на С-киназную систему кальциевой регуляции, запускаемую БАВ.

Обращение эффектов винпоцетина и НП в присутствии БАВ может быть обусловлено тем, что оксид азота, используя в качестве вторичного посредника цГМФ, уменьшает натриевую и кальциевую проводимость мембраны и снижает эффективность оперирования С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы ГМК. Суперпозиция этих противоположных по результату влияний на ПД и сокращения определяет функциональный конечный ответ ГМК мочеточника.

По-видимому, в интактных ГМК доминируют эффекты ослабления угнетающего влияния ПК-С на ПД и сокращения. В условиях активации гистамином натриевой проводимости и снижения каль-

циевой проводимости фенилэфрином преобладают эффекты, связанные с действием NO на ионную проводимость мембраны.

Нельзя исключить и другого варианта развития событий. Известно, что при активации метаболизма мембранных фосфоинозитидов происходит резкое увеличение внутриклеточной концентрации цГМФ [41, 94, 97, 108, 125]. Винпоцетин, ингибируя преимущественно ФДЭ 1-го типа, использующие в качестве субстрата цГМФ [26, 73, 90], обеспечивает еще больший прирост содержания этого ЦН в клетке. Поскольку сродство наиболее активной ФДЭ к цГМФ примерно на порядок выше, чем к цАМФ [26, 49, 64, 84], вследствие переключения фермента на гидролиз цГМФ в клетках может происходить накопление цАМФ [5, 11] и развитие ранее упомянутых угнетающих электрическую и сократительную активность ГМК эффектов [4, 5, 7, 9—11, 19, 22, 35, 36, 40, 48, 51, 79, 93, 96, 98, 116, 117, 122, 126, 127, 129, 139].

Влияние неселективного ингибитора ФДЭ IBMX на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника, вероятнее всего, демонстрирует такие итоги повышения внутриклеточной концентрации цАМФ, реализуемые за счет чувствительного к ТЭА повышения калиевой проводимости мембраны ГМК.

Добавление дибутирил-цАМФ вызывало, подобно IBMX, угнетение сокращения ГМК, тогда как дибутирил-цГМФ (как НП и ВП) активировал сокращения ГМК мочеточника [16, 17, 19, 21]. Следует отметить, что эффекты дибутирил-цАМФ, но не дибутирил-цГМФ изменяли свою миогенную направленность при 10-кратном увеличении концентрации, приводя к усилению сокращений ГМК мочеточника при снижении длительности плато ПД [16, 17, 19, 21].

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 их эффектов в значительной степени определяет направленность изменений электрогенеза и сокращений ГМК. При этом цАМФ снижает длительность плато ПД и угнетает сокраще-

ние ГМК за счет активации калиевой проводимости мембраны, а цГМФ усиливает их сокращения, снижая при этом еще и натриевую проницаемость мембраны. Кроме того (см. гл. 2), активация сокращений ГМК мочеточника цГМФ может быть связана с увеличением вклада ретикулярного Ca^{2+} , а также с ингибированием ПК-С.

Влияние оксида азота на $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспорт в ГМК мочеточника

В последние годы активно обсуждается роль и место $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспорта в сократительных реакциях гладких мышц на действие физических факторов (осмотическое давление), химических и биологически активных веществ [38, 42, 44, 45, 112, 115, 120]. Было показано, что в ГМК аорты выключение $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспорта существенно изменяло эффективность действия нитросоединений [42, 44, 45]. Однако влияние модуляции $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспорта на сопряжение возбуждения — сокращения в ГМК, а также действие NO на эти процессы не изучалось.

Ингибитор $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспорта буметанид [44, 45, 115] гиперполяризовал мембрану и снижал силу сокращений ГМК мочеточника морской свинки [21]. Так как на эти эффекты практически не влияли блокатор калиевых каналов ТЭА и безнатриевые растворы, можно предположить, что основную роль в гиперполяризации мембраны ГМК играют нарушения процесса перераспределения ионов хлора (Cl^-) при угнетении буметанидом механизмов оперирования $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспорта. Имеются сведения о способности буметанида играть роль антагониста хлорной проницаемости мембран в ГМК [42, 76].

В ГМК внутриклеточная концентрация ионов Cl^- существенно превышает ту, которая следует из расчетной в условиях пассивного распределения этих ионов через мембрану. Если неравное распределение этих анионов в основном поддерживается переносом через $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспорт, то его ингибирование буметанидом ведет к уменьшению внутриклеточной концентрации ионов хлора и, как следствие, к снижению выходящего потока его через мембрану и развитию ее гиперполяризации.

Предварительная обработка гладкомышечных препаратов буметанидом ослабляла активацию сокращений ГМК мочеточника НП [21]. И на фоне нитросоединения буметанид вызывал зависимое от дозы угнетающее действие не только сократительной, но и электрической активности ГМК мочеточника. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что одним из эффекторов оксида является $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспортер.

Чтобы окончательно утвердиться в этом предположении, проводились эксперименты с БАВ, и оказалось, что предварительная обработка буметанидом достоверно снижала активирующий эффект гистамина и мезатона на ПД и сокращения ГМК мочеточника. Угнетающие ГМК эффекты буметанида на фоне БАВ были также значительно сильнее выражены, чем в интактных ГМК, и они усиливались при увеличении концентрации ингибитора $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспорта [21].

Эти данные указывают на то, что одним из компонентов влияния стимуляции α_1 -адрен- и H_1 -гистаминергических рецепторов мембраны ГМК мочеточника является модуляция хлорных токов, например кальций-зависимых, величина которых зависит от электрохимического потенциала этих анионов, создаваемого $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспортом. Увеличение вклада хлорных токов в электрогенез ГМК при действии БАВ обуславливает рост чувствительности электрической и сократительной активности к действию ингибитора $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспорта — буметанида.

Полученные результаты дают основания предполагать, что более сильное влияние оксида азота в присутствии БАВ обусловлено, по крайней мере частично, уменьшением деполаризующего хлорного тока вследствие ингибирования ПК-С и деактивации $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспорта. Угнетающее влияние цГМФ на хлорные каналы хорошо известно [72, 86, 91, 93, 120, 138].

Заключение

Многочисленные гормоны, медиаторы, простагландины и другие БАВ, а также лекарственные вещества, взаимодействуя со специфическими мембранными рецепторами, оказывают свое регулирующее влияние на клетки через систему вторичных посредников: цАМФ, цГМФ, ионы кальция и

продукты метаболизма мембранных фосфоинозитидов [4, 30, 34, 35, 93, 94, 118, 126].

К настоящему времени накоплено большое количество данных об участии оксида азота в поддержании постоянного баланса физиологических и патофизиологических процессов в самых различных биологических объектах [24, 25, 27, 29, 31, 32, 37, 46, 47, 50, 51, 54, 59, 61, 73, 77, 81, 82, 96, 97, 128, 132, 135, 136, 142]. Есть основания полагать, что важную роль в патогенезе таких патологических процессов, как бронхиальная астма, гипертоническая болезнь, дискинезии органов ЖКТ и т.д. [5, 10—12, 19, 28, 54, 73, 75, 81, 82, 135], играют нарушения синтеза и/или эффекторных механизмов сигнального пути, опосредованного оксидом азота. Вполне вероятно, что ключевую роль в их коррекции будут играть воздействия, направленные на восстановление нормальной продукции NO и его взаимодействий с основными внутриклеточными сигнальными системами гладкомышечных клеток. Таким образом, выяснение значимости, особенностей оперирования и функциональных проявлений этих процессов открывает новые перспективы понимания механизмов регуляции клеток, органов и систем.

Многочисленные исследования процессов активации и поддержания сократительного ответа однозначно указывают на то, что изменения уровня цитоплазматического Ca^{2+} играет главенствующую роль в цикле сокращение — расслабление гладких мышц [4, 30, 34, 35, 93, 118, 126]. Это делает проблему регуляции сокращения идентичной проблеме метаболизма Ca^{2+} .

Оксид азота как физиологический регулятор метаболизма ионов кальция имеет ряд особенностей. Прежде всего, это газ, который взаимодействует не с рецепторами плазматической или внутриклеточных мембран, а непосредственно активирует фермент-растворимую фракцию гуанилатциклазы. Об этом свидетельствуют многочисленные литературные данные, полученные на различных сосудах [73, 81, 82, 135]. Проведенные исследования показали, что, несмотря на ряд принципиальных различий в механизмах сопряжения возбуждения — сокращения в ГМК сосудов, ЖКТ и мочеочника, мишенью для NO в этих

клетках является растворимая фракция ГЦ [5, 10—12, 14—21, 28, 54, 73, 75, 81, 82, 135].

Характерной чертой сопряжения возбуждения — сокращения в ГМК, как и в кардиомиоцитах, является использование внеклеточных ионов кальция, которые участвуют как в процессах возбуждения (генерация ПД), так и активации сокращения. При возбуждающем действии агонистов вход Ca^{2+} из внешней среды в ГМК осуществляется по двум типам кальциевых каналов: рецептор-управляемым, стимулируемым БАВ и потенциал-зависимым, открывающимся при деполяризации мембраны.

Расслабляющее действие оксида азота на ГМК аорты и угнетение сокращений *taenia coli* могло быть связано с уменьшением входящих токов ионов Ca^{2+} . Однако проведенные исследования показали, что донор оксида азота НП не оказывал прямого влияния на потенциал-зависимые и рецептор-управляемые пути входа ионов кальция в ГМК. Ограничение потенциал-зависимого потока кальция является следствием повышения калиевой проводимости мембраны, реполяризации и закрытия части потенциал-зависимых кальциевых каналов.

Эксперименты с блокаторами калиевых каналов и анализ вольт-амперных характеристик мембраны ГМК показали, что NO модулирует два компонента калиевой проводимости мембраны: Ca^{2+} -активируемую и АТФ-чувствительную. Эти данные еще раз подтверждают точку зрения М.Ф. Шубы [39, 40], что в ГМК изменения калиевой проводимости мембраны, в отличие от других электровозбудимых структур, играют доминирующую роль в реализации различных регуляторных воздействий.

Другим фактором, влияющим на потенциал-зависимый вход ионов Ca^{2+} являются хлорные токи, смещающие МП ГМК в сторону деполяризации мембраны. Принципиальным отличием ГМК от других электровозбудимых структур является наличие высокого электрохимического потенциала для ионов Cl⁻, направленного наружу, поддерживаемое переносом этих анионов посредством $Na^+K^+-2Cl^-$ -котранспорта. Так как его ингибитор буметанид в ГМК мочеочника снижает эффекты НП, можно предположить, что влияние оксида азота

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 в сравнении с его внеклеточным пулом [39, 40]. Однако в присутствии ингибитора Ca^{2+} -АТФазы СПР тапсигаргина значительно ослаблялось активирующее действие НП на сокращения ГМК мочеточника. Эти данные можно рассматривать как свидетельство того, что природа активации сокращения ГМК мочеточника частично обусловлена стимуляцией донором NO кальциевого насоса СПР, повышенная предзагрузка которого Ca^{2+} повышает значимость этой фракции в обеспечении сокращений.

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 и цГМФ. Вероятно, при высоких концентрациях цАМФ происходит накопление внутри ГМК и цГМФ [5, 49], что отражается соответствующим изменением сократительных реакций ГМК мочеточника, уже характерным для этого циклического нуклеотида, и, по-видимому, стимулируемых NO процессов.

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о возможности независимого и разнонаправленного действия цГМФ и цАМФ на сопряжение возбуждения — сокращения в гладкомышечных клетках мочеточника при определенных концентрационных соотношениях этих циклических нуклеотидов в клетке. При этом цАМФ снижает длительность плато потенциала действия и угнетает сокращение за счет активации калиевой проводимости мембраны, а цГМФ усиливает сокращения гладкомышечных клеток, снижая при этом натриевую проводимость мембраны и увеличивая вклад ретикулярного Ca^{2+} в

генерацию сокращений изучаемой гладкой мышцы.

Проведенные исследования указывают на особую роль ПК-С в механизмах действия оксида азота на сократительные свойства ГМК. Известно, что в естественных условиях стимуляция этого пути передачи сигналов сопряжена с рецептор-управляемым входом ионов кальция в ГМК и активацией обеих ветвей кальциевой сигнальной системы: кальмодулин-зависимой и С-киназной [4, 30, 34, 35, 40, 94, 118, 126].

Более выраженное влияние НП на индуцированное БАВ сокращение гладких мышц аорты, чем на вызванное хлоридом калия, обусловлено, прежде всего, их различной природой. Гиперкалиевая контрактура обеспечивается притоком кальция извне по неактивирующимся кальциевым каналам плазмалеммы. Поддерживаемое сокращение при действии агонистов α_1 -адренергических и H_1 -гистаминергических рецепторов обеспечивается оперированием С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы. В первом случае реполяризация и снижение МН могут быть достигнуты за счет угнетения кальциевой или (и) активации калиевой проводимостей мембраны ГМК. Во втором — проявляются эффекты нитропруссид натрия (NO), оказывающего расслабляющее действие, вероятнее всего, направленное на протеинкиназу С или на процессы, индуцируемые активацией этого фермента.

По-видимому, отсутствие расслабляющего и реполяризующего действия НП в гиперкалиевом ТЭА-содержащем растворе может служить свидетельством вовлечения калиевой проводимости мембраны в механизмы действия NO на контрактуру гладких мышц аорты, вызванную депполяризацией мембраны. Если сокращение этих гладких мышц вызвано стимуляцией рецепторов, которые активируют метаболизм мембранных фосфоинозитидов и в присутствии блокатора калиевой проводимости мембраны (ТЭА), сохранение обычного влияния НП на мембранный потенциал и механическое напряжение ГМК указывает на то, что донор оксида азота (НП) реализует свое действие через С-киназный путь передачи внутриклеточного сигнала.

В ГМК мочеточника оксид азота вызывает реакции, противоположные тем, которые развиваются в гладких мышцах аорты. Как показано в работах [3—4, 6, 19], в ГМК мочеточника и *taenia coli* С-киназная система регуляции электрической и сократительной активности использует эффекторные механизмы, отличные от тех, которые оперируют в сосудистых ГМК. И включение этого внутриклеточного пути передачи сигналов ведет к угнетению электрической и сократительной активности за счет увеличения калиевой проводимости мембраны вследствие стимуляции натрий-протонного обмена. NO снижает индуцированную БАВ активность протеинкиназы С и таким образом высвобождает ГМК мочеточника от тормозящего влияния последней. Этот механизм, наряду с увеличением предзагрузки кальцием СПР, обеспечивает стимуляцию оксидом азота сократительной активности ГМК мочеточника.

Литература

1. Авдонин П.В., Алтухова И.П. Блокирование активатором протеинкиназы С, форболовым эфиром, рецепторзависимых кальциевых каналов тромбоцитов // Биохимия. 1985. Т. 50. С. 1235—1240.
2. Артеменко Д.П., Бурый В.А., Владимирова И.А., Шуба М.Ф. Модификация метода одиночного сахарозного мостика // Физиол. журн. 1982. Т. 28. С. 377—380.
3. Баскаков М.Б., Студницкий В.Б., Медведев М.А. и др. Роль протеинкиназы С в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц: эффект форболового эфира // Бюл. эксп. биол. и мед. 1987. \langle 7. С. 8—11.
4. Баскаков М.Б., Медведев М.А., Ковалев И.В. и др. Механизмы регуляции функций гладких мышц вторичными посредниками. Томск: Гавань. 1996. 154 с.
5. Баскаков М.Б., Капилевич Л.В., Медведев М.А. и др. Внутриклеточные сигнальные системы в эпителии и гладких мышцах воздухоносных путей // Пульмонология. 1997. \langle 2. С. 72—76.
6. Баскаков М.Б., Ковалев И.В., Капилевич Л.В., Медведев М.А. Роль натрий-протонного обмена в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2000. Т. 86. \langle 1. С. 68—75.
7. Воронников А.В., Крымский М.А., Ширинский В.П. Внутриклеточная сигнализация и фосфорилирование белков при сокращении гладких мышц // Биохимия. 2002. Т. 67. Вып. 12. С. 1587—1610.
8. Грибкова И.В., Шуберт Р., Серебряков В.М. NO активирует выход Ca^{2+} -активируемого K^+ -тока гладкомышечных клеток хвостовой артерии крысы через cGMP // Кардиология. 2002. Т. 42. \langle 8. С. 34—38.
9. Григорьев Н.Б., Шварц Г.Я., Григорьев Д.А. Взаимодействие нитроглицерина с тиоловыми соединениями // Хим. фарм. журн. 1991. Т. 25. \langle 5. С. 12—14.
10. Капилевич Л.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А. и др. Эпителиально-гладкомышечное взаимодействие в регуляции тонуса воздухоносных путей // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1995. Т. 81. \langle 7. С. 99—105.
11. Капилевич Л.В., Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А. Внутриклеточные сигнальные системы в эпителии- и эндотелийзависимых процессах расслабления гладких мышц // Успехи физиол. наук. 2001. Т. 32. \langle 2. С. 88—98.
12. Капилевич Л.В., Носарев А.В., Дьякова Е.Ю. и др. Особенности регуляции гладких мышц сосудистой стенки легочной артерии кролика // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2002. Т. 83. \langle 4. С. 452—458.
13. Клещев А.Л., Демидов М.Я., Седов К.Р. Биохимические аспекты действия натрия нитропруссиды // Эксп. и клин. фармакол. 1994. Т. 57. \langle 2. С. 74—78.
14. Ковалев И.В., Панов А.А., Баскаков М.Б. и др. Влияние нитропруссиды натрия на мембранный потенциал и механическое напряжение гладкомышечных клеток аорты крысы // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1997. Т. 83. \langle 7. С. 70—76.
15. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Капилевич Л.В. и др. Исследование роли внутриклеточного пула Ca^{2+} в релаксирующем эффекте нитропруссиды натрия в гладкомышечных полосках аорты крысы // Бюл. эксп. биол. и мед. 1999. Т. 127. \langle 2. С. 177—179.
16. Ковалев И.В., Панов А.А., Бородин Ю.Л. и др. Влияние нитросоединений на электромеханическое сопряжение гладкомышечных клеток мочеточника // Бюл. эксп. биол. и мед. 2000. Т. 129. \langle 5. С. 539—541.
17. Ковалев И.В., Попов А.Г., Панов А.А. и др. Исследование механизмов NO-зависимого расслабления гладких мышц аорты крысы с помощью нитросоединений // Эксп. и клин. фармакол. 2001. Т. 64. \langle 3. С. 33—36.
18. Ковалев И.В., Попов А.Г., Баскаков М.Б. и др. Влияние ингибиторов фосфодиэстераз циклических нуклеотидов на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток // Бюл. эксп. биол. и мед. 2002. Т. 133. \langle 1. С. 47—50.
19. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А. и др. Миогенные эффекты циклического гуанозинмонофосфата в гладкомышечных клетках. Роль протеинкиназы С // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 89. \langle 4. С. 436—446.
20. Ковалев И.В., Попов А.Г., Баскаков М.Б. и др. Влияние буметанида, ингибитора $Na^+K^+-2Cl^-$ -котранспорта на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки // Бюл. эксп. биол. и мед. 2003. Т. 135. \langle 8. С. 167—173.
21. Ковалев И.В., Попов А.Г., Баскаков М.Б. и др. Исследование цГМФ-зависимых механизмов действия винпоцетина на гладкомышечные клетки // Эксп. и

- клин. фармакол. 2003. Т. 66. < 4. С. 25—28.
22. Кондратюк Т.М., Курский М.Д. Мембранные механизмы релаксирующего воздействия цАМФ в гладкомышечных волокнах миомерия // Докл. РАН. 1992. Т. 324. < 1. С. 220—223.
23. Кочемасова Н.Г. Роль ионов кальция в формировании плато потенциала действия гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки в безнатриевых растворах // Физиол. журн. 1982. Т. 28. < 2. С. 206—214.
24. Малышев И.Ю., Малышева Е.В. Белки теплового шока и защита сердца // Бюл. эксп. биол. и мед. 1998. Т. 126. < 12. С. 604—611.
25. Марков Х.М. О биорегуляторной системе L-аргинин-окись азота // Патол. физиология и эксп. терапия. 1996. < 1. С. 34—39.
26. Медведева М.В. Современные представления о многообразии форм ФДЭ циклических нуклеотидов в тканях млекопитающих // Биохимия. 1995. Т. 60. Вып. 3. С. 25—32.
27. Петренко Ю.М., Шашурин Д.А., Титов В.Ю. Новые источники оксида азота, их возможная физиологическая роль и значение // Эксп. и клин. фармакол. 2001. Т. 26. < 2. С. 72—80.
28. Поленов М.А. Окись азота в регуляции функции желудочно-кишечного тракта // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. 1998. < 1. С. 53—61.
29. Раевский К.С. Оксид азота — новый физиологический мессенджер: возможная роль при патологии центральной нервной системы // Бюл. экпер. биол. и мед. 1997. Т. 123. < 5. С. 484—490.
30. Расмуссен Г. Циркуляция кальция и внутриклеточная передача сигнала // В мире науки. 1989. < 12. С. 36—43.
31. Реутов В.П., Орлов С.Н. Физиологическое значение гуанилатциклазы и роль окиси азота и нитросоединений в регуляции активности этого фермента // Физиология человека. 1993. Т. 19. < 1. С. 124—137.
32. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1998. 159 с.
33. Солнцева Е.И., Буканова Ю.В. Циклический ГМФ имитирует потенцирующий эффект ноотропа винпоцетина на высокопороговый А-ток нейронов моллюска // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1998. Т. 84. < 8. С. 741—746.
34. Северина И.С. Роль растворимой гуанилатциклазы в механизмах ее физиологических эффектов // Вопросы мед. химии. 2002. Т. 48. Вып. 1. С. 4—30.
35. Ткачук В.А. Гормональная регуляция транспорта Ca^{2+} в клетках крови и сосудов // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1998. Т. 84. < 10. С. 1006—1018.
36. Ткачук В.А. Фосфоинозитидный обмен и осцилляции ионов Ca^{2+} // Биохимия. 1998. Т. 62. Вып. 1. С. 47—56.
37. Уманский С.Р. Апоптоз: молекулярные и клеточные механизмы // Мол. биология. 1996. Т. 30. < 3. С. 487—502.
38. Уразаев А.Х. Натрий-калий-хлорный котранспорт клеточной мембраны // Успехи физиол. наук. 1998. Т. 29. < 2. С. 12—39.
39. Шуба М.Ф., Бурый В.А. Мембранные механизмы возбуждения гладкомышечных клеток // Физиол. журн. 1984. Т. 30. < 5. С. 545—559.
40. Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г. Физиология сосудистых гладких мышц. Киев: Наукова думка, 1988. 250 с.
41. Abdel-Latif A. Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases and contraction in smooth muscle // Exp. Biol. Med. 2001. V. 226. < 3. P. 153—163.
42. Adragna N., White R., Orlov S., Lauf P. K—Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: possible implication in vasodilation // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2000. V. 278. < 2. P. 381—390.
43. Ahn S.C., Lee S.J., Goo Y.S. et al. Protein kinase C suppresses spontaneous, transient, outwards K^+ currents through modulation of the Na/Ca exchanger in guinea-pig gastric myocytes // Pflügers Arch. 2001. V. 441. P. 417—424.
44. Akar F., Skinner E., Klein J. et al. Vasoconstrictors and nitrovasodilators reciprocally regulate the $Na^+—K^+—2Cl^-$ cotransporter in rat aorta // Am. J. Physiol. 1999. V. 276 (6 Pt. 1). P. 1383—1390.
45. Akar F., Jiang G., Paul R., O'Neill W. Contractile regulation of the $Na(+)—K(+)—2Cl(-)$ cotransporter in vascular smooth muscle // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2001. V. 281. < 2. P. C579—584.
46. Akimoto T., Kusano E., Muto S., Asano Y. The effect of erythropoietin on interleukin-1beta mediated increase in nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells // J. Hypertension. 1999. V. 17. N 9. P. 1249—1256.
47. Alcyn S., Morales S., Camello P.J. et al. A redox-based mechanism for the con-tractile and relaxing effects of NO in the guinea-pig gall bladder // J. Physiol. 2001. V. 532. < 3. P. 793—810.
48. Bae Y., Kim K., Park J. et al. Ca^{2+} -dependent membrane currents in vascular smooth muscle cells of the rabbit // Life Sci. (Engl.). 2001. V. 69. < 21. P. 2451—2466.
49. Barnes P.J. Cyclic nucleotides and phosphodiesterases and airway function // Eur. Respir. J. 1995. V. 8. P. 457—462.
50. Begum N., Sandu O.A., Duddy N. Negative regulation of rho signaling by insulin and its impact on actin cytoskeleton organization in vascular smooth muscle cells: role of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate signaling pathways // Diabetes. 2002. V. 51. < 7. P. 2256—2263.
51. Bialecki R.A., Stinson-Fisher C. KCa channel antagonists reduce NO donor-mediated relaxation of vascular and tracheal smooth muscle // Am. J. Physiol. 1995. V. 268. < 1. P. L152—159.
52. Boer C., van der Linden P.J., Scheffer G.J. RhoA/Rho kinase and nitric oxide modulate the agonist-induced pulmonary artery diameter response time // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2002. V. 282. < 3. P. H990—998.
53. Bolz S.S., Galle J., Derwand R. et al. Oxidized LDL increases the sensitivity of the contractile apparatus in

- isolated resistance arteries for Ca(2+) via a rho- and rho kinase-dependent mechanism // *Circulation*. 2000. V. 102. < 19. P. 2402—2410.
54. Bradley K., Buxton I., Barber J. et al. Nitric oxide relaxes human myometrium by a cGMP-independent mechanism // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 275. < 6. P. 1668—1673.
 55. Brandt D., Gimona M., Hillmann M. et al. Protein kinase C induces actin reorganization via a Src- and Rho-dependent pathway // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. < 23. P. 20903—20910.
 56. Bratz I., Falcon R., Partridge L., Kanagy N. Vascular smooth muscle cell membrane depolarization after NOS inhibition hypertension // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002. V. 282. < 5. P. H1648—1655.
 57. Bulbring E., Tomita T. Effects of Ca removal on the smooth muscle of guinea pig taenia coli // *J. Physiol. (Gr. Brit.)*. 1970. V. 210. P. 217—232.
 58. Criddle D., Meireles A., Macedo L. et al. Comparative inhibitory effects of niflumic acid and novel synthetic derivatives on the rat isolated stomach fundus // *J. Pharmacol.* 2002. V. 54. < 2. P. 283—288.
 59. Carter R.W., Begaye M., Kanagy N. Acute and chronic NOS inhibition enhances alpha(2)-adrenoreceptor-stimulated RhoA and Rho kinase in rat aorta // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002. V. 283. < 4. P. H1361—1369.
 60. Cavarape A., Endlich N., Assaloni R. et al. Rho-kinase inhibition blunts renal vasoconstriction induced by distinct signaling pathways in vivo // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003. V. 14. < 1. P. 37—45.
 61. Chang Y., Ceacareanu B., Dixit M. et al. Nitric oxide-induced motility in aortic smooth muscle cells: role of protein tyrosine phosphatase SHP-2 and GTP-binding protein Rho // *Circ. Res.* 2002. V. 91. < 5. P. 390—397.
 62. Chitale K., Webb R. Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signaling // *Hypertension*. 2002. V. 39. < 2. P. 438—442.
 63. Coats P., Johnston F., MacDonald J., McMurray J. Signalling mechanisms underlying the myogenic response in human subcutaneous resistance arteries // *Cardiovasc. Res.* 2001. V. 49. < 4. P. 828—837.
 64. Corbin J., Turko I., Beasley A., Francis S. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. < 9. P. 2760—2767.
 65. Collins P., Henderson A., Lang D., Lewis M.J. Endothelium-derived relaxin factor and nitroprusside. Compared in noradrenaline and K⁺ contracted rabbit and rat aortae // *J. Physiol.* 1988. V. 400. P. 395—404.
 66. Crowley C.M., Lee C.H., Gin S.A., Van Breemen C. The mechanism of excitation contraction coupling in phenylephrine-stimulated human saphenous vein // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002. V. 283. < 4. P. H1271—1281.
 67. Damron D.S., Kanaya N., Homma Y. et al. Role of PKC, tyrosine kinases, and Rho kinase in alpha-adrenoreceptor-mediated PASM contraction // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2002. V. 283. < 5. P. L1051—1064.
 68. Di Fulvio M., Lincoln T., Lauf P., Adragna N. Protein kinase G regulates potassium chloride cotransporter-3 expression in primary cultures of rat vascular smooth muscle cells // *J. Biol. Chem. (USA)*. 2001. V. 276. < 24. P. 21046—21052.
 69. Drewett J.G., Garbers D.L. The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands // *Endoc. Rev.* 1994. V. 15. < 2. P. 135—162.
 70. Fan J., Byron K. Ca²⁺ signalling in rat vascular smooth muscle cells: a role for protein kinase C at physiological vasoconstrictor concentrations of vasopressin // *J. Physiol.* 2000. V. 524. (Pt. 3). P. 821—831.
 71. Fukuta H., Kito Y., Suzuki H. Spontaneous electrical activity and associated changes in calcium concentration in guinea-pig gastric smooth muscle // *J. Physiol.* 2002. V. 540. < 1. P. 249—260.
 72. Fuller C., Benos D. Ca²⁺-activated Cl⁻ channels: a newly emerging anion transport family // *News Physiol. Sci.* 2000. V. 15. < 8. P. 165—171.
 73. Furchgott R., Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // *Nature*. 1980. V. 288. P. 373—376.
 74. Ganitkevich V., Isenberg G. Caffeine-induced release and reuptake of Ca²⁺ by Ca²⁺ stores in myocytes from guinea-pig urinary bladder // *J. Phys.* 1992. V. 458. P. 99—111.
 75. Genoveva M., Gromez M., Gromez J. Nitric oxide as a regulator of hemodynamic changes in pregnancy // *Ginecol. Obstet. Mex.* 1999. V. 67. P. 29—36.
 76. Gillen C.M., Bliss F. Functional interaction of the K—Cl cotransporter with the Na—K—2Cl cotransporter in HEK—293 cells // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 276. P. C328—336.
 77. Goyal R., He X. Evidence for NO redox form of nitric oxide as nitroergic inhibitory neurotransmitter in gut // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 275 (5 Pt. 1). P. G1185—1192.
 78. Guh J., Hwang T., Ko F. et al. Antiproliferative effect in human prostatic smooth muscle cells by nitric oxide donor // *Mol. Pharmacol.* 1998. V. 53. < 3. P. 467—474.
 79. Hein T., Kuo L. CAMP-independent dilation of coronary arterioles to adenosine: role of NO, G proteins, and K(ATP) channels // *Circ. Res.* 1999. V. 85. < 7. P. 634—642.
 80. Huber A.P., Trudrung, Storr M. et al. Protein kinase G expression in the small intestine and functional importance for smooth muscle relaxation // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 275. (4 Pt. 1). P. G629—637.
 81. Ignarro L., Buga G., Wood K. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and secreted from artery and vein is nitric oxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84. P. 9265—9269.
 82. Ignarro L., Cirino G., Casini A. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999. V. 34. < 6. P. 879—886.
 83. Janssen L.J., Lu-Chao H., Netherton S. Excitation-contraction coupling in pulmonary vascular smooth muscle involves tyrosine kinase and Rho kinase // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2001. V. 280. < 4. P. L666—674.
 84. Jiang H., Colbran L., Francis S.H., Corbin J.D. Direct

- evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 1015—1019.
85. Jones K., Wong G., Jankowski C. et al. cGMP modulation of Ca^{2+} sensitivity in airway smooth muscle // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 276. \langle 1. P. L35—40.
86. Jury J., Patel M., Bowes T., Daniel E.E. Actions of putative chloride channel blocking agents on canine lower esophageal sphincter (LES) // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2001. V. 79. \langle 12. P. 1007—1014.
87. Kannan M., Johnson D. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels // *Life Sci.* 1995. V. 56. \langle 25. P. 2229—2238.
88. Karaki H., Nakagawa N., Urakawa H. Comparative effects of verapamil and sodium nitroprusside on contraction and $45Ca$ uptake in the smooth muscle of rabbit aorta, rat aorta // *Br. J. Pharmacol.* 1984. V. 81. P. 393—400.
89. Kawada T., Ishibashi T., Sasage H. et al. Modification by LY 83583 and methylene blue of relaxation induced by nitric oxide, glyceryl trimorol, sodium nitroprusside and atriopeptin in aortae of the rat, guinea-pig and rabbit // *Gen. Pharmacol.* 1994. V. 25. \langle 7. P. 1361—1371.
90. Kiss B., Karpati E. Mechanism of action of vinpocetine // *Acta. Pharm. Hung.* 1996. V. 66. P. 213—224.
91. Kitamura K., Yamazaki J. Chloride channels and their functional roles in smooth muscle tone in the vasculature // *Jpn. J. Pharmacol.* 2001. V. 85. \langle 4. P. 351—357.
92. Kumar R., Cartledge W., Lincoln T., Pandey K. Expression of guanylyl cyclase-A/atrial natriuretic peptide receptor blocks the activation of protein kinase C in vascular smooth muscle cells. Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase // *Hypertension.* 1997. V. 29. \langle 1. P. 414—421.
93. Kuriyama H., Kitamura K., Itoh T., Inoue R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels // *Physiol. Rev.* 1998. V. 78. P. 811—920.
94. Lee M., Severson D. Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action // *Am. J. Physiol.* 1994. V. 267. P. 659—687.
95. Lee M., Li L., Kitazawa T. Cyclic GMP causes Ca^{2+} desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. \langle 8. P. 5063—5068.
96. Lincoln T., Dey N., Boerth N., Cornwell T. Nitric oxide-cyclic GMP pathway regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation: implications in vascular diseases // *Acta Physiol. Scand.* 1998. V. 164. \langle 4. P. 507—515.
97. Lincoln T., Dey N., Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression // *J. Appl. Physiol.* 2001. V. 91. \langle 3. P. 1421—1430.
98. Liu H., Xiong Z., Sperelakis N. Cyclic nucleotides regulate the activity of L-type calcium channels in smooth muscle cells from rat portal vein // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997. V. 29. \langle 5. P. 1411—1421.
99. Lovren F., Triggle C. Involvement of nitrosothiols, nitric oxide and voltage-gated K^+ channels in photorelaxation of vascular smooth muscle // *Eur. J. Pharmacol.* 1998. V. 347. \langle 2—3. P. 215—221.
100. Lu G., Mazet B., Sarr M., Szurszewski J. Effect of nitric oxide on calcium-activated potassium channels in colonic smooth muscle of rabbits // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 274. (5 Pt. 1). P. G848—856.
101. Lynn J., Hughes A. Phospholipase C isoforms, cytoskeletal organization, and vascular smooth muscle // *News Physiol. Sci.* 2000. V. 15. \langle 2. P. 41—45.
102. Massett M., Ungvari Z., Csiszar A. et al. Different roles of PKC and MAP kinases in arteriolar constrictions to pressure and agonists // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002. V. 283. \langle 6. P. H2282—22877.
103. Masumoto A., Mohri M., Shimokawa H. et al. Suppression of coronary artery spasm by the Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina // *Circulation.* 2002. V. 105. \langle 13. P. 1545—1547.
104. Matsumura Y., Kita S., Okui T. Mechanisms of endothelin-1-induced potentiation of noradrenaline response in rat mesenteric artery // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2001. V. 28. \langle 7. P. 540—544.
105. Maxwell M., Goldie R., Henry P. Ca^{2+} signalling by endothelin receptors in rat and human cultured airway smooth muscle cells // *Br. J. Pharmacol.* 1998. V. 125. \langle 8. P. 1768—1778.
106. Mikawa K., Kume H., Takagi K. Effects of atrial natriuretic peptide and 8-brom-cyclic guanosine monophosphate on human tracheal smooth muscle // *Arzneimittelforschung.* 1998. V. 48. \langle 9. P. 914—918.
107. Mita M., Yanagihara H., Saito M., Walsh M.P. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase // *Biochem. J.* 2002. V. 364. \langle 2. P. 431—440.
108. Murthy K., Makhlof G. Differential regulation of phospholipase A2 (PLA2)-dependent Ca^{2+} signaling in smooth muscle by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. Inhibitory phosphorylation of PLA2 by cyclic nucleotide-dependent protein kinases // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. \langle 51. P. 34519—34526.
109. Murthy K., Grider J., Makhlof G. Heterologous desensitization of response mediated by selective PKC-dependent phosphorylation of $G_{(i-1)}$ and $G_{(i-2)}$ // *Am. J. Physiol.* 2000. V. 279. \langle 4. P. 925—934.
110. Nagao T., Vanhout P. Hesperpolarization as mechanism for endothelium-dependent relaxation in porcine coronary artery // *J. Physiol.* 1992. V. 445. P. 355—367.
111. Nelson M., Quayle J. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle // *Am. J. Physiol.* 1995. V. 268. P. 799—822.
112. O'Donnell M., Owen N. Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle // *Physiol. Rev.* 1994. V. 74. \langle 3. P. 683—721.
113. Oishi K., Takatoh Y., Bao J., Uchida M.K. Contractile responses and myosin phosphorylation in reconstituted fibers of smooth muscle cells from the rat cerebral artery // *Jpn. J. Pharmacol.* 2002. V. 90. \langle 1. P. 36—50.

114. Okogbule A., Ibe B., Yue B. Phosphodiesterase activity in intra-pulmonary arte-ries and veins of perinatal lambs // *Mol. Gen. Metab.* 1998. V. 65. < 3. P. 229—237.
115. Orlov S.N., Tremblay J., Hamet P. Bumetanide-sensitive ion fluxes in vascular smooth muscle cells: lack of functional Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransport // *J. Membr. Biol.* 1996. V. 153. P. 125—135.
116. Orlov S., Tremblay J., Hamet P. cAMP signaling inhibits dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ influx in vascular smooth muscle cells // *Hypertens.* 1996. V. 27. P. 774—780.
117. Piper A., Greenwood I., Large W. Dual effect of blocking agents on Ca²⁺-activated Cl(-) currents in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells // *J. Physiol.* 2002. V. 539 (Pt. 1). P. 119—131.
118. Rasmussen H., Waisman D. Modulation of cell function in the calcium messenger system // *Rev. Pharmacol. Physiol. Biochem.* 1982. V. 95. P. 111—148.
119. Rohra D., Saito S., Ohizumi Y. Functional role of Cl-channels in acidic pH-induced contraction of the aorta of spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats // *Eur. J. Pharmacol.* 2002. V. 453. < 2—3. P. 279—286.
120. Russell J. Sodium-potassium-chloride cotransport // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80. < 1. P. 211—276.
121. Sakurada S., Okamoto H., Takuwa N. et al. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001. V. 281. < 2. P. C571—578.
122. Satake N., Shibata M., Shibata S. The involvement of KCa, KATP and KV channels in vasorelaxing responses to acetylcholine in rat aortic rings // *Gen. Pharmacol.* 1997. V. 28. < 3. P. 453—457.
123. Sauzeau V., Le Jeune H., Cario-Toumaniantz C. et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase signalling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. < 28. P. 21722—21729.
124. Shimokawa H., Hiramori K., Iinuma H. et al. Anti-anginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2002. V. 40. < 5. P. 751—761.
125. Soloviev A.I., Parshikov A.V., Stefanov A.V. Evidence for the involvement of protein kinase C in depression of endothelium-dependent vascular responses in spontaneously hypertensive rats // *J. Vasc. Res.* 1998. V. 35. < 5. P. 325—331.
126. Somlyo A.P., Somlyo A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle // *Nature.* 1994. V. 372. P. 231—236.
127. Sperelakis N. Properties of calcium channels in cardiac muscle and vascular smooth muscle // *Molecular. and Cell Biochem.* 1990. V. 99. P. 97—109.
128. Suzuki H., Yamamoto Y., Fukuta H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vasodilatation // *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1998. V. 112. < 3. P. 195—202.
129. Taguchi K., Ueda M., Kubo T. Effects of cAMP and cGMP on L-type calcium channel currents in rat mesenteric artery cells // *Jpn. J. Ph.* 1997. V. 74. < 2. P. 179—186.
130. Tertyshnikova S., Yan X., Fein A. GMP inhibits IP3-induced Ca²⁺ release in intact rat megakaryocytes via cGMP- and cAMP-dependent protein kinases // *J. Physiol. (Lond).* 1998. V. 512 (Pt. 1). P. 89—96.
131. Upchurch G.R., Welch G.N., Loscalzo J. The vascular biology of S-nitrosothiols, nitrosated derivatives of thiols // *Vascular Med.* 1996. < 1. P. 25—33.
132. Vaandrager A.B., de Jonge H.R. Signalling by cGMP-dependent protein kinases // *Mol. Cell. Biochem.* 1996. V. 157. < 1—2. P. 23—30.
133. Van Riper D., McDaniel N., Rembold C. Myosin light chain kinase phosphorylation in nitrovasodilator induced swine carotid artery relaxation // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1355. < 3. P. 323—330.
134. Van Bavel E., Meulen E.T., Spaan J.A. Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries // *Exp. Physiol.* 2001. V. 86. < 5. P. 585—592.
135. Vanhoutte P. Endothelial dysfunction and vascular disease // *Kon. acad. geneesk., Belg.* 1998. V. 60. < 3. P. 251—266.
136. Wang D., Wei J., Hsu K. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on systemic hypotension, cytokines and inducible nitric oxide synthase expression and lung injury following endotoxin administration in rats // *J. Biom. Sci.* 1999. V. 6. P. 28—35.
137. Wang Z., Jin N., Ganguli S. et al. Rho-kinase activation is involved in hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001. V. 25. < 5. P. 628—635.
138. Waniishi Y., Inoue R., Morita H. et al. Cyclic GMP-dependent but G-kinase-independent inhibition of Ca²⁺-dependent Cl-currents by NO donors in cat tracheal smooth muscle // *J. Physiol. (Lond).* 1998. V. 511 (Pt. 3). P. 719—731.
139. Word R., Cornwel T. Regulation of cGMP-induced relaxation and cGMP-dependent protein kinase in rat myometrium during pregnancy // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 274. (3 Pt. 1). P. C748—756.
140. Wu X., Somlyo A.V., Somlyo A.P. Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 220. < 3. P. 658—663.
141. Xiong Z., Sperelakis N., Fenoglio-Reiser R. Regulation L-type calcium channels by cyclic nucleotides and phosphorylation in smooth muscle cells from rabbit portal vein // *J. Vasc. Res.* 1994. V. 31. < 5. P. 271—279.
142. Yamakage M., Hirshman C.A., Croxton T. Sodium nitroprusside stimulates Ca²⁺-activated K⁺ channels in porcine tracheal smooth muscle cells // *Am. J. Physiol.* 1996. V. 270. < 3. P. L338—345.
143. Yashiro Y., Duling B.R. Participation of intracellular Ca²⁺ stores in arteriolar conducted responses // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003. V. 285 (Pt. 1). P. H65—73.
144. Zhang D., Wang Z., Jin N. Microtubule disruption modulates the Rho-kinase pathway in vascular smooth muscle // *J. Muscl. Res. Cell. Mot.* 2001. V. 22. < 2. P. 193—200.

Передовая статья

Поступила в редакцию 14.01.2004 г.