

На правах рукописи

КОВАЛЕВ ИГОРЬ ВИКТОРОВИЧ

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОКСИДОАЗОТА
ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ И СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ
ГЛАДКИХ МЫШЦ**

03.00.13. - физиология

03.00.02. биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

ТОМСК - 2002

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Важная роль оксида азота (NO) в обеспечении межклеточной и внутриклеточной сигнализации получила много экспериментальных подтверждений, а R Furchgott, L. Ignarro, and F. Murad, открывшие сигнальные функции оксида азота, были удостоены Нобелевской премии.

Первые оксид азота в качестве регулятора физиологических процессов стал рассматриваться после исследований природы **релаксирующего фактора (ЭРФ)**, синтезируемого **эндотелиоцитами** сосудов [Ignarro L., e.a., 1987; Furchgott R., Vanhoutte P., 1989; Luscher T., 1989; Moncada S., 1992]. Хотя природа и механизмы действия ЭРФ остаются до конца не выясненными, большинством исследователей он идентифицируется с оксидом азота, продуктом NO-синтаз (NOS) [Капилевич Л.В. с соавт., 1995-2001; Furchgott R., Vanhoutte P., 1989; Ignarro L., e.a., 1987, 1999].

К настоящему времени показана экспрессия генов **NO-синтаз** не только в эндотелии сосудов и эпителии воздухоносных путей, но и в **различных мышечных и немышечных структурах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)** [Huber A., e.a., 1998; Selemidis S., e.a., 1998] и матки [Barber A., 1999]. Оказалось, что оксид азота способствует нормальному процессу имплантации яйцеклетки [Gouge R., e.a., 1998], а его концентрация в тканях **миометрия** достигает **максимального значения непосредственно перед родами** [Genoveva D-R. M., e.a., 1999].

В последние годы было показано, что оксид азота является **нейротрансмиттером** в некоторых центральных и периферических синапсах [Browne S, e.a., 1999; Dawson V.; Dawson T., 1998; Goyal R., He X., 1998; Ito Y. 1998; Taylor B.]. **Нитроксидаэргическая** иннервация присутствует в органах ЖКТ и в репродуктивной системе, где ее стимуляция угнетает спонтанную активность **гладкомышечных** клеток (ГМК) тонкого **кишечника**, матки и фаллопиевых труб [Поленов М.А., 1998; Ekerhovd E., e.a., 1998, 1999; Denninger J., Marietta M. 1999; Shibata C., e.a., 1998]. Эти данные позволяют рассматривать оксид азота в качестве **первичного посредника**, обеспечивающего не только локальную, но и дистантную регуляцию гладкомышечных органов.

Большой прогресс в изучении **NO-зависимых** реакций был достигнут, в связи с открытием способности некоторых **нитросоединений** воспроизводить эффекты оксида азота [Реутов В.П., Орлов С.Н., 1993; Ignarro L., e.a., 1987, 1999]. Феноменология влияния оксида азота и **нитросоединений-доноров NO** на сократительную функцию гладких мышц достаточно хорошо известна. Во всех исследованных типах мышц доноры NO вызывали уменьшение механического напряжения, угнетали, если таковая имела, спонтанную активность и снижали величину сократительных ответов на действие биологически активных веществ [Капилевич Л.В. с соавт., 1995-2001; Ковалев И.В. с соавт., 1997-2001; Поленов М.А., 1998; Furchgott R., Vanhoutte P., 1989; Luscher T., 1989; Moncada S., 1992].

Гораздо менее полно исследовано действие нитросоединений на электрические свойства ГМК, и практически отсутствуют сведения о влиянии NO на сопряжение **возбуждения-сокращения** в гладких мышцах. Имеются данные о действии этих препаратов на потенциал-зависимую, **кальций-активируемую** и **АТФ-чувствительную** компоненты калиевой проводимости мембраны [White R., e.a., 1993; Lovren F., Triggle S., 1998], но вклад каждой из них в изменения **электрогенеза ГМК** до сих пор не ясен.

Малоизученными остаются и **механизмы влияния оксида азота** на эффективность оперирования основных **внутриклеточных сигнальных систем** гладких мышц: **кальмодулин-зависимой** и **С-киназой** ветвей **кальциевой** и **цАМГ**-опосредованной систем передачи сигналов.

От классических первичных посредников, регулирующих функции гладких мышц, оксид азота отличается тем, что индуцирует **НО-зависимые** внутриклеточные процессы без взаимодействия с рецепторами плазматической и внутриклеточных мембран, а посредством активации **цитозольного** фермента - растворимой фракции **гуанилатциклазы** (ГЦ) [Реутов В.П., Орлов С.Н., 1993; Северина И.С., 1995; Palmer R., 1988; Drewett J., Garbers D., 1994]. Повышение внутриклеточной концентрации цГМФ и активация соответствующих **протеинкиназ** (ПК-G) [Lincoln T., e.a., 2001; Vaandrager A., 1996], играют основную роль в **реализации** эффектов NO. Однако, значительная неоднородность **эффектов** цГМФ, их **видо- и тканеспецифичность** [Lincoln T., e.a., 2001], как и открытие все большего количества новых **изоформ** ПК G [Tamura K, Itoh H., 1996] значительно усложняет изучение **цГМФ-зависимых** процессов.

Выступая в качестве вторичного **посредника**, цГМФ снижает уровень цитозольного Ca^{2+} в ГМК [Lincoln T., e.a., 1994, 2001; Vaandrager A.B., 1996], угнетая его вход через потенциал-зависимые и **рецептор-управляемые** каналы [Collins P. e.a., 1988; Sperelakis N., Xiong Z. e.a., 1994], а также стимулируя его удаление наружу [Сергеев П.В. с соавт., 1993;] и депонирование в **саркоплазматический ретикулум** [O'Donnel M., 1994]. Вместе с тем, имеются данные о том, что цГМФ не влияет на проводимость мембраны ГМК для ионов кальция [Байдан Л.В. с соавт., 1987].

Нет единого мнения о способах, механизмах и роли взаимодействия цГМФ и **цАМФ** в ГМК. Известна их общая способность к угнетению кальциевой [Liu H., Xiong Z., Sperelakis N., 1997] и активации калиевой проводимости мембраны ГМК [Kurokawa Y., e.a., 1998]. Суперпозиция эффектов этих циклических **нуклеотидов** обусловливается как различным сродством к **фосфодиэстеразам** (ФДЭ), так и способностью к конкурентной активации или **ингибированию** этих ферментов [Медведева М.В., 1995; Jiang H., e.a., 1993; Corbin J., e.a., 2000]. Многообразие модулирующих воздействий цГМФ на Ca^{2+} - и **цАМФ-опосредованные** реакции, наличие общих мишеней для соответствующих протеинкиназ, вызывает сомнения в способности цГМФ самостоятельно выполнять функции вторичного посредника в ГМК [Rasmussen H., 1982]

Оксиду **азота**, кроме **сигнальных**, присущи **цитопротекторные** и **цитотоксические** функции [Мальшев И.Ю., Мальшева Е.В., 1998; Реутов В.П. с соавт., 1998; Brune V., 1997; Bundy R., 1999; Taylor B., 1997]. К настоящему времени накоплено большое количество данных об участии NO в развитии патологических процессов и, в частности, бронхиальной астмы и гипертонической болезни [Ignarro L., e.a., 1999; Vanhoutte P., 1998]. Сочетание деструктивных и защитных эффектов NO, позволяют считать эту молекулу одной из центральных фигур в поддержании жизнеобеспечения **клеток**, основанном на существовании баланса между физиологическими и патофизиологическими процессами. Поэтому выяснение механизмов, используемых биологическими системами с участием NO в физиологических процессах и патофизиологических **реакциях**, как и факторов, определяющих границы сигнальных и повреждающих функций этой молекулы, является актуальной задачей современной биологии и медицины.

Резюмируя изложенное, можно заключить, что несмотря на значительные успехи, достигнутые в исследовании механизмов регуляции оксидом азота функций гладких мышц, многие вопросы не нашли удовлетворительного решения. Существенная, а в ряде случаев и ключевая роль NO в обеспечении физиологических функций и патофизиологических реакций клеток, выдвигает это направление в качестве насущной проблемы современной биологии и медицины. Все это определяет настоятельную необходимость изучения основных закономерностей и особенностей реализации сигнальной функции оксида азота в различных типах ГМК.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

Изучить роль оксида азота в механизмах оперирования внутриклеточных сигнальных систем гладких мышц.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние **нитросоединений-доноров** оксида азота на электрические свойства и сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы.
2. Исследовать действие оксида азота на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеточника и *taenia coli* морской свинки.
3. Исследовать роль растворимой фракции **гуанилатциклазы** гладкомышечных клеток в механизмах действия оксида азота на **электрорегенез** и сокращения гладких мышц.
4. Изучить участие **NO-зависимых** процессов в механизмах оперирования кальциевой сигнальной системы в гладких мышцах.
5. Изучить **NO-зависимую** компоненту регуляции **протеинкиназой С** электрических и сократительных свойств гладких мышц.
6. Исследовать влияние оксида азота на оперирование **цАМФ-опосредованной** сигнальной системы гладкомышечных клеток.
7. Изучить роль **Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ - котранспорта** в NO-зависимых процессах регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Расслабление и реполяризация мембраны гладкомышечных клеток аорты крысы, мочеточника и *taenia coli* при действии донора оксида азота **нитропруссид** натрия и нитроглицерина обусловлены активацией растворимой фракцией гуанилатциклазы
2. Влияние оксида азота опосредуется потенциал-зависимыми и потенциал-нечувствительными механизмами, относительный вклад которых определяет направленность изменений сократительных реакций гладкомышечных клеток.
3. Релаксирующие и **реполяризирующие** мембрану ГМК эффекты оксида азота развиваются за счет модуляции ионной проводимости мембраны. Потенциал-независимый контроль **гладкомышечного** тонуса осуществляется через изменение эффективности оперирования С-киназой ветви кальциевой сигнальной системы и **Са²⁺-насоса саркоплазматического ретикулума**.
4. Направленность **действия** циклических **нуклеотидов** на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника зависит от изменений внутриклеточного соотношения **цГМФ/цАМФ**, индуцированных оксидом азота.
5. Влияние оксида азота на сокращения гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки осуществляется с участием **Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ - котранспортера**.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

Впервые установлена относительная роль электро- и **фармако-механического** сопряжения в механизмах действия оксида азота. Показано, что активация биологически активными веществами рецепторов, стимулирующих метаболизм мембранных **фосфоинозитидов**, усиливала **релаксирующий** эффект доноров оксида азота.

Впервые показано, что реализация эффектов оксида азота опосредована потенциал-зависимыми и **потенциал-нечувствительными** внутриклеточными механизмами, относительный вклад которых обуславливает направленность изменений **электрорегенеза** и сокращений ГМК.

Потенциал-зависимые эффекты донаторов оксида азота связаны с угнетением кальциевой и/или натриевой **проводимостей** и модуляцией кальций-зависимой и

АТФ-чувствительной компонент калиевой проводимости мембраны ГМК. Потенциально-нечувствительные эффекты доноров оксида азота связаны с угнетением С-киназной ветви кальциевой регуляции электрической и сократительной активности ГМК.

Впервые обнаружено, что в отличие от нитропруссид натрия, **релаксирующие** эффекты нитроглицерина обусловлены угнетением кальциевой проводимости мембраны ГМК **цГМФ-независимым** способом.

Впервые показана ключевая роль изменений внутриклеточного отношения **цГМФ/цАМФ**, индуцированных оксидом азота, в определении **направленности** сократительных реакций в **гладкомышечных** клетках мочеочника

Впервые установлено, что стимулирующее влияние оксида азота на сократительную активность ГМК мочеочника осуществляется с участием Na^+ , K^+ , 2Cl^- **котранспортера**.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

Результаты исследования **являются** вкладом в развитие фундаментальных представлений о механизмах внутриклеточной регуляции общего и локального тонуса гладкомышечных органов и сосудов. Показано, что механизмы взаимодействия оксида азота с основными внутриклеточными сигнальными системами зависят от особенностей их оперирования в процессах регуляции функций гладких мышц.

Отмечена особая роль С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы гладких мышц в определении направленности и потенцировании **релаксирующих** эффектов доноров оксида азота. Получены новые сведения о том, что увеличение внутриклеточного отношения цГМФ/цАМФ может определять направленность эффектов оксида азота в ГМК.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии дополнительных механизмов действия **нитросоединений** и препаратов, изменяющих внутриклеточный уровень **цГМФ** и **цАМФ**, на сократительную активность гладкомышечных клеток. Это должно способствовать более тщательному отбору препаратов для фармакологической **коррекции** в случае дисфункций гладкомышечных органов с учетом их способности не только к **релаксирующим**, но и к **контрактильным** эффектам.

Основные положения работы используются в курсах 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 кафедрах биофизики и функциональной диагностики и нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского **университета**. Области применения полученных данных являются физиология, **биофизика**, фармакология.

Апробация работы. Основные результаты диссертации обсуждены на международных конгрессах «United European **Gastroenterology Week**» (Oslo, 1994) и «**Intern.Congress of patophysiology**»(Kyoto, 1994); «The **19** scientific Meeting of the International Society of Hypertension, and **12th** European Meeting on Hypertension (June 23 - 27, 2002. Prague, Czech Republic)»; на **VII-IX** национальных конгрессах по болезням органов дыхания (**Москва, 1997-1999**); на международных конференциях «**Нейрогуморальные** механизмы регуляции органов пищеварительной системы" (Томск, 1997) и «Актуальные вопросы **кардиологии**»(г.Томск, 2000); на II международном симпозиуме «Физико-химические основы функционирования белков и их комплексов» (Воронеж, 1998); на XVII и XVIII съездах Всероссийского физиологического общества им.

И.П. Павлова (Ростов-на-Дону, 1998; Казань, 2001); на межрегиональных научных конференциях «Медико-биологические аспекты нейрогуморальной регуляции» (Томск, 1997); Сибири и Дальнего Востока, посвящ. 150-летию со дня рожд. акад. Павлова И.П. (Томск, ТГУ, 1999); Проблемы нейрогуморальной регуляции физиологических функций висцеральных систем, посвященной 100-летию со дня рожд проф. Д.Я. Криницина (Омск, ИВМ и ОмГАУ, 2000), на IV Съезде физиологов Сибири с международным участием (Новосибирск, 2002).

Основные результаты диссертации опубликованы в 44 печатных работах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 220 страницах машинописного текста. Состоит из введения, трех глав описания собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 54 рисунками и 1 таблицей. Список литературы содержит 467 источников, включая 95 отечественных и 372 иностранных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили изолированные препараты гладких мышц аорты белых беспородных **крыс-самцов, мочеочника** и **taenia coli** морской **свинки**.

После удаления эндотелия из средней части аорты приготавливались полоски шириной 0,6-0,7 мм, длиной -10-12мм. Из очищенных от соединительной ткани мочеочников приготавливались сегменты, а из **taenia coli** — полоски длиной **10-12 мм**.

Для одновременной регистрации электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток использовалась методика двойного сахарозного моста [Артеменко Д.П. с соавт., 1982]. Отведение электрических потенциалов (изменений мембранного потенциала покоя спонтанных и вызванных электрическим стимулом потенциалов действия) проводили с помощью неполяризующихся электродов. Механическое напряжение (МН) и сокращения **гладкомышечных** полосок регистрировали **механотроном 6МХ2Б** в **условиях**, близких к изометрическому.

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

В качестве контрольных (100%) служили значения амплитуды **анэлектротонического** потенциала (АЭП), параметров потенциала действия (**ПД**) (амплитуда пиковой компоненты, величина и длительность плато) и амплитуды сокращения ГМК в растворе Кребса в ответ на электрический стимул, или изменения мембранного потенциала покоя (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.

Используемые растворы:

Раствор сахарозы в концентрации 0,3 М на основе деионизированной воды с удельным сопротивлением 15 **МОМ × см**.

Раствор Кребса следующего состава (в мМ): **NaCl** - 120,4; **KCl** - 5,9; **CaCl₂** - 2,5; **NaH₂PO₄** - 1,2; **NaHCO₃** или **трис(оксиметил)-аминометана**- 15,5; **MgCl₂** - 1,2; глюкозы - 11,5. Значения pH растворов поддерживались в пределах 7,35 - 7,40; при температуре **37±0,1° С**.

Модифицированные растворы Кребса:

1. Гиперкалиевые растворы с концентрацией **KCl** 40, **60** и **120 мМ**.
2. **Безнатриевые** растворы с эквимольным замещением **NaCl** на **холинхлорид**.

3. Бескальциевые растворы с добавлением 0,1 и 1 мМ этиленгликоль-бис-(аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N',-тетрауксусной кислоты (ЭГТА).

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

Используемые реактивы: фенилэфрин (Мезатон), гистамин, кофеин (Кофеин-бензоат натрия, все-Россия), верапамил, (финоптин, Орион, Финляндия), изадрин, глибенкламид; метилснвовый синий, нитропруссид натрия, буметанид, 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX), кальфостин С (Calphostin C), тапсигаргин (Thapsigargin, все-, Sigma); тетраэтиламмония хлорид (ТЭА) и форболовый эфир (phorbol miristoyl-13-acetyl, ФМА -Serva); нитроглицерин (Nitroject, SUN, Индия), дибутирил-цАМФ и дибутирил- цГМФ (Boehringer Mannheim GmbH, Германия), винпоцетин (Гедон Рихтер), пропранолол (Inderal, ICI).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

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

1.2. В ГМК, помещенных в гиперкалиевый раствор (40 мМ), развивалась деполаризация мембраны, и росло механическое напряжение. Полученные при этом изменения МП и МН были приняты в качестве контрольных значений (100%).

При добавлении нитросоединений в концентрациях 0,1-1000мкМ предсокращенные хлоридом калия препараты аорты крысы, мочеточника и taenia coli морской свинки расслаблялись. Это расслабление сопровождалось реполяризацией мембраны ГМК (Рис.1).

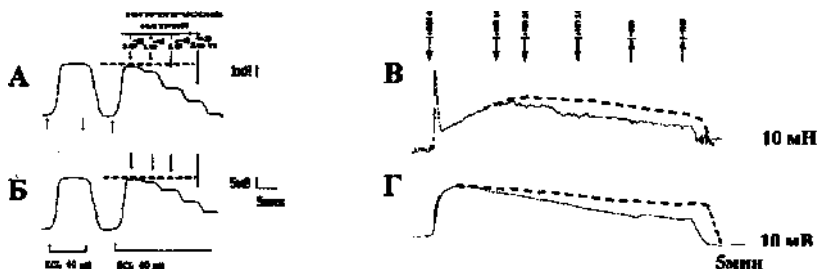


Рис.1. Влияние нитропруссида натрия (НП) на мышечное напряжение (А,В) и мембранный потенциал (Б,Г) гладкомышечных клеток аорты крысы (А и Б) и taenia coli морской свинки (В и Г), предсокращенных гиперкалиевым (КС1 40) раствором. Стрелками обозначено начало и конец действия тестирующих веществ.

Прерывистой линией отмечены исходные электрические и сократительные ответы ГМК в отсутствии НП. Справа калибровочный сигнал и отметка времени.

Нитропруссид натрия (НП) в концентрации 1мкМ на 5-8 мин вызывал достоверное снижение МН и реполяризацию мембраны ГМК аорты до величин $86\pm 1\%$ и

$84 \pm 2\%$ ($n=8; p<0,05$) от контрольных значений в 40 мМ растворе хлорида калия. Увеличение концентрации НП приводило к усилению **реполяризирующего** и **релаксирующего** действия, и при 1мМ значения МП и МН ГМК аорты крысы составляли $15 \pm 3\%$ и $14 \pm 1\%$ ($n=8; p<0,05$) от контрольных. Концентрация **нитропруссид** натрия, вызывающая полумаксимальный расслабляющий эффект (EC_{50}) ГМК аорты, равна 10 мкМ.

Сходное действие НП оказывал на ГМК **taenia coli** и мочеочника морской свинки, но величина расслабления этих гладких мышц при тех же концентрациях НП была достоверно ниже, чем аорты (**Рис.2, В, Г**).

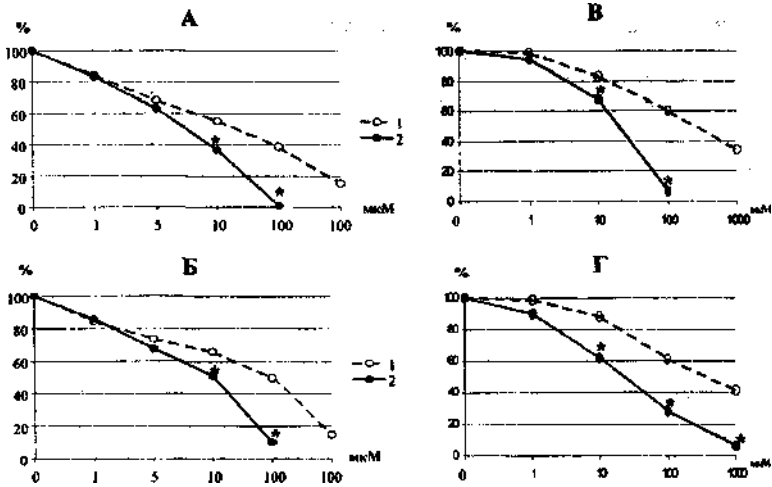


Рис.2. Влияние нитропруссид натрия и нитроглицерина на механическое напряжение (А,В) и мембранный потенциал (Б,Г) ГМК аорты (А,Б) и *taenia coli* (В,Г).

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 исходных в гиперкалиевом (40 мМ) растворе.

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

EC_{50} НП для ГМК *taenia coli* равна 0,1 мМ, а для мочеочника - 1 мМ.

Таким образом, чувствительность гладких мышц к оксиду азота убывала в ряду: аорта > *taenia coli* > мочеочник.

Нитроглицерин (НГ) в ГМК аорты начиная в концентрации 1мкМ, уже на 2-3 мин. снижал уровень МП до $91 \pm 5\%$ и МН до $87 \pm 5\%$ ($n=8, p<0,05$) от контрольных значений в 40 мМ растворе хлорида калия. Увеличение концентрации НГ вело к дальнейшему снижению уровня мембранного потенциала и механического напряжения. При концентрации НГ в гиперкалиевом растворе, равной 100 мкМ, уровень МП и МН ГМК аорты крысы приближались к исходным значениям в нормальном растворе Кребса (**Рис.2**). EC_{50} НГ для ГМК аорты равна 5мкМ.

Таким образом, НГ действовал более быстро и уже в микромолярных концентрациях полностью расслаблял и реполяризовал ГМК аорты.

Отличия в действии нитроглицерина на мембранный потенциал и механическое напряжение ГМК вероятнее всего обусловлены его структурой, предполагающей более высокую **липофильность** и, следовательно, **мембранотропность**, и особенностями **метаболизма**, который связан с образованием **нитрозотиолов** - активаторов ГЦ [Григорьев Н.Б., с соавт., 1991; Северина И.С., 1995; Upchurch G., e.a., 1996; Abderrahmane A., e.a., 1998].

При повторном или однократном длительном действии НГ в ГМК аорты развивалась толерантность [Сумароков А.Б. 1989; Hasegawa K., e.a., 1999], что затрудняло его использование в качестве тестирующего агента.

1.3 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 **100 мкМ** и выше НП и НГ угнетали спонтанную и вызванную электрическую и сократительную активность ГМК taenia coli (Рис.3, А, Б).

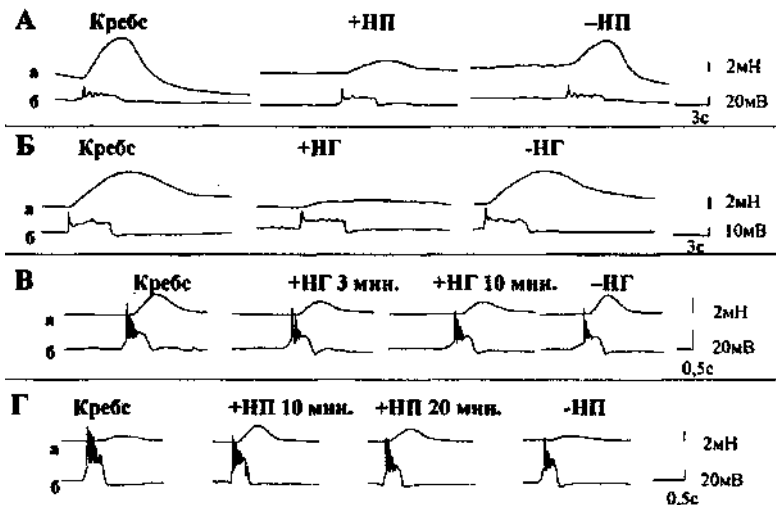


Рис.3. Влияние нитропруссид натрия и нитроглицерина на сократительную и электрическую активность ГМК taenia coli (А и Б) и мочеточника (В и Г) морской свинки.

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 сигналы отметка времени

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 отрицательным влиянием нитросоединений на потенциал-зависимую кальциевую проводимость мембраны ГМК.

Вызванные электрическим стимулом потенциалы действия и сокращения **гладкомышечных** клеток мочеточника также угнетались нитроглицерином в диапазоне концентраций **10-500 мкМ** (Рис.3, В).

В концентрации 10 мкМ НГ на 3-5 мин.: уменьшал амплитуду сокращений до $73 \pm 9\%$, а длительность плато до $91 \pm 6\%$ от исходных в нормальном растворе **Кребса**. Этот угнетающий эффект был обратим и зависел от концентрации **нитроглицерина** в растворе. В присутствии 500 мкМ НГ 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 НП не изменял электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника, но в концентрации 100 мкМ НП увеличивал амплитуду сокращений до $130 \pm 7\%$ ($n=11; p<0.01$) от исходных значений в нормальном растворе **Кребса**. Длительность плато ПД при этом практически не изменялась.

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

Реполяризирующее и релаксирующее действие нитросоединений на ГМК может быть связано с их способностью высвобождать оксид азота или образовывать **нитрозотиолы**, которые активируют 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; Drewett J., Garbers D., 1994; Wang Y., e.a., 1995].

Метиленовый синий (1-10 мкМ) не влиял на исходный уровень МП и МН ГМК аорты крысы, но полностью устранял релаксирующее и реполяризирующее действие НП на предсокращенный 40мМ хлорида калия гладкомышечный препарат (Рис.4).

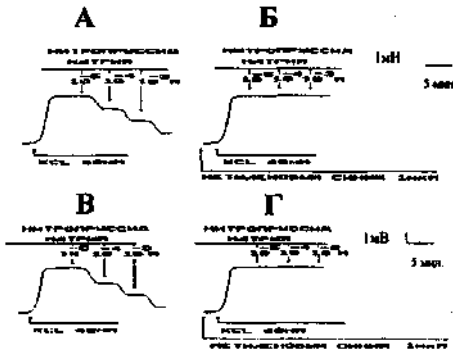


Рис.4. Влияние метиленового синего на эффекты нитропруссид натрия на механическое напряжение (А, Б) и мембранный потенциал (В, Г) ГМК аорты крысы в гиперкалиевом (КСl 40) растворе **Кребса**.

А и В - контрольные расслабление и реполяризация мембраны ГМК при действии нитропруссид натрия в концентрации 10-1000 мкМ;

Б и Г- то же, что А и В, но в присутствии 1мкМ метиленового синего.

Остальные обозначения как на **Рис. 1**.

Ослабление эффекта нитропруссид натрия после предобработки ингибитором ГЦ метиленовым синим, было характерно и для ГМК мочеточника и *taenia coli*, предсокращенных гиперкалиевым (40ММ) раствором.

При действии 10 мкМ метиленового синего вызванные электрическим стимулом ПД и сокращения ГМК мочеточника морской свинки не изменялись, но устранялось усиление нитропруссидом натрия вызванных сокращений ГМК мочеточника (Рис.5,А,Б).

Нитроглицерин, в отличие от нитропруссид натрия, продолжал угнетать ПД и сокращения ГМК мочеточника и в присутствии ингибитора ГЦ. После предобработ-

ки метиленовым синим, добавление 100 мкМ НГ приводило к снижению амплитуды сокращения и длительности плато ПД до величин $58\pm4\%$ и $78\pm5\%$ ($n=8$, $p<0,05$), что соответствовало эффекту НГ в отсутствии метиленового синего (с. 10). Более того, эффект НГ оставался обратимым и на фоне действия ингибитора ГЦ (Рис.5,Г).

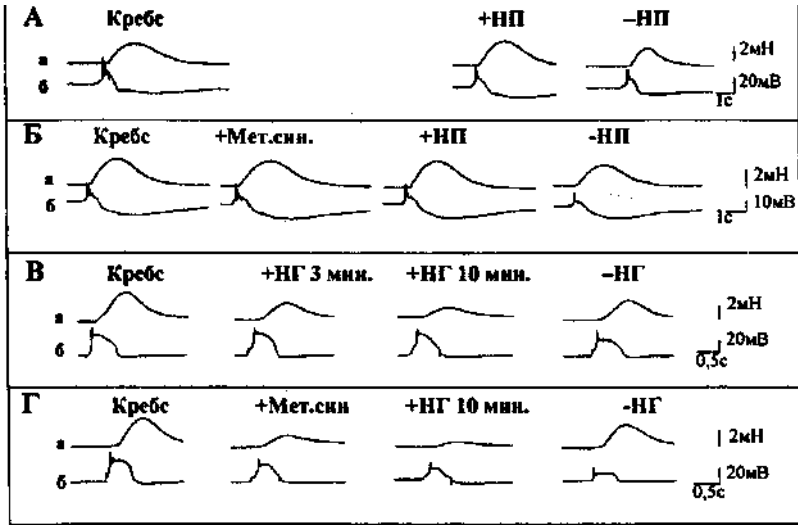


Рис. 5. Влияние нитропрусида натрия и нитроглицерина на сокращения и потенциала действия ГМК мочеоточника в присутствии метиленового синего.

А - действие 100 мкМ нитропрусида натрия (+НП) в нормальном растворе Кребса.

Б - то же, что и А в присутствии 10 мкМ метиленового синего (+Мет.синий).

В - действие 100 мкМ нитроглицерина (+НГ);

Г - то же, что и В в присутствии 10 мкМ метиленового синего (+МС).

Остальные обозначения как на рис.3.

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

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

3. Исследование влияния оксида азота на кальциевую систему регуляции электрической и сократительной активности ГМК.

Главствующая роль кальциевой сигнальной системы в цикле сокращение-расслабление гладких мышц в настоящее время не вызывает сомнения [Шуба М.Ф.с соав. 1984-1988; Kuriyama Н. е.а., 1998]. Источниками ионов кальция, необходимых для активации и поддержания сокращения, являются внеклеточное пространство и внутриклеточные депо. Были проведены исследования влияния NO на эффективность оперирования этого пути передачи сигнала в ГМК.

3.1. Для активации потенциал-зависимого входа ионов кальция через деполяризованную мембрану проводилось предсокращение ГМК аорты крысы растворами с концентрацией КС1 40 мМ, 60 мМ и 120 мМ. В этих условия происходило увеличение МП до $138\pm8\%$ и МН до $140\pm11\%$ (60 мМ КС1) и $191\pm3\%$ и $149\pm3\%$ соответственно в растворе, содержащем 120 мМ КС1 ($n=8$; $p<0,05$). Значения МП и МН в растворе с 40

мМ КС1 приняты за 100%. Реполяризирующее и релаксирующее влияние нитропруссид натрия на ГМК оставалось на одном уровне, но исчезало при 120 мМ КС1 (Рис.6;1-3).

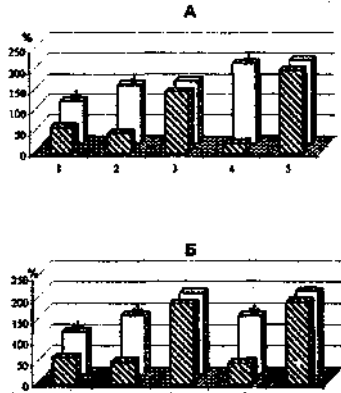
Рис.6. Влияние нитропруссид натрия на механическое напряжение (А) и мембранный потенциал (Б) ГМК аорты, предсокращенные различными реагентами:

- 1 – 40 мМ хлорида калия;
- 2 – 60 мМ хлорида калия;
- 3 – 120 мМ хлорида калия;
- 4 – 1 мкМ фенилэфрина;
- 5 – 120 мМ хлорида калия и 1 мкМ фенилэфрина.

Заштрихованные столбцы -то же, что и светлые при действии 10 мкМ НП.

За 100% взяты значения механического напряжения и мембранного потенциала в гиперкалиевом (40 мМ) растворе

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



3.2. Для более детального изучения потенциал-зависимых механизмов действия NO использовались блокаторы кальциевых каналов и модифицирующие содержание внеклеточного кальция и натрия растворы.

3.2.1. Блокатор потенциал-зависимых кальциевых каналов верапамил в концентрации 10 мкМ расслаблял и реполяризовал мембрану ГМК аорты крысы, предсокращенных гиперкалиевым раствором (40 мМ), до величин $53 \pm 2\%$ и $68 \pm 1\%$ ($n=6; p<0,05$) соответственно. Добавление на фоне верапамила 10 мкМ НП приводило к полному расслаблению и дополнительной реполяризации мембраны ГМК до $52 \pm 3\%$ ($n=6; p<0,05$) относительно контрольных значений в гиперкалиевом растворе.

Верапамил на фоне действия НП вызывал полное расслабление гладкомышечных полосок аорты и снижение МП с $65 \pm 1\%$ до $50 \pm 1\%$ ($n=6; p<0,05$) от контрольных значений в 40 мМ растворе хлорида калия. Следовательно, ограничение входящего потока ионов кальция верапамилем ослабляло реполяризирующие и усиливало релаксирующие эффекты нитропруссид натрия.

Полученные данные свидетельствуют о том, что действие NO на ГМК, видимо, обусловлено не только угнетающим влиянием на входящий по потенциал-зависимым кальциевым каналам поток ионов Ca^{2+} , но и значительным участием потенциал-нечувствительных механизмов расслабления гладких мышц, проявляющихся на фоне действия блокатора потенциал-зависимых кальциевых каналов верапамила.

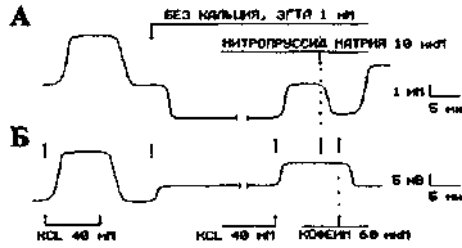
3.2.2. В следующей серии экспериментов ГМК аорты помещали в бескальциевые растворы Кребса, содержащий 0.1 и 1 мМ ЭГТА. В этих растворах исходное МН снижалось до $50 \pm 3\%$ и развивалась деполяризация мембраны ГМК до $31 \pm 5\%$ от контрольных значений в 40 мМ растворе хлорида калия ($n=6; p<0,0$).

В бескальциевом растворе влияние хлорида калия на МП и МН ослабевало более чем вдвое. Значения МП и МН составляли величины $45 \pm 2\%$ и $40 \pm 2\%$ ($n=6; p<0,05$) относительно действия гиперкалиевого раствора в контрольных экспериментах. Механическое напряжение ГМК при этом достигало значений, близких к исходным, в нормальном растворе Кребса. Следует отметить, что сокращения ГМК при действии хлорида калия имели транзиторный характер (Рис.7).

Рис. 7. Влияние нитропруссид натрия и потенциала (А) и механические напряжение (Б) в бескальциевом ЭГТА-содержащем растворе.

Стрелками обозначено добавление/удаление соответствующих тестирующих веществ в раствор Krebsа и его бескальциевую модификацию.

Остальные обозначения как на рис. 1



Развитие МН гладкой мышцы при действии хлорида калия в бескальциевых растворах указывает на сохранность в этих условиях внутриклеточного пула ионов кальция, достаточного для инициации сокращения. Добавление на этом фоне НП в концентрации 10 мкМ, полностью устраняло сократительные ответы ГМ на KCl, не влияя на уровень МП ГМК аорты крысы.

Использование бескальциевых ЭГТА-содержащих растворов позволяет снизить вне- и, опосредованно, внутриклеточную концентрацию ионов кальция, о чем свидетельствует падение МН гладкомышечных полосок аорты крысы. Деполяризация мембраны ГМК, при этом, могла быть связана с увеличением проницаемости мембраны для ионов натрия и уменьшением внутриклеточной концентрации ионов кальция. Последнее ведет к уменьшению или полному устранению значимой для поддержания потенциала покоя сосудистых ГМК кальций-зависимой калиевой проводимости мембраны ГМК [Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г., 1988; Kuriyama H., e.a., 1998]. Полученные данные указывают на то, что реполяризация мембраны ГМК при действии НП в гиперкалиевом растворе Кребса, вероятно, связана с изменениями калиевой проводимости мембраны

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 имели место, не могли привести к заметным изменениям МП.

Известно, что генерация ПД ГМК мочеточника обусловлена изменениями проводимости мембраны к ионам кальция, натрия и калия. [Кочемасова Н.Г., Шуба М.Ф., 1982].

3.2.3. Для выделения кальциевой компоненты ПД наружные ионы натрия замещались холинхлоридом, и в этих условиях ПД приобретали пиковый характер, обусловленный входом ионов кальция по потенциал-зависимым каналам.

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 в безнатриевом растворе (Рис.8), Такие изменения ПД и, как следствие, сокращений, могли быть связаны с прямым угнетением оксидом азота потенциал-зависимой кальциевой и/или с повышением калиевой проводимости мембраны ГМК. Для выяснения этого вопроса использовали блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний [Кочемасова Н.Г., 1982].

Добавление 5 мМ ТЭА в безнатриевый раствор (Рис.8,В) приводило к появлению плато ПД и усилению сокращений. В таких условиях НП не влиял на ПД и сокращения ГМК мочеточника.

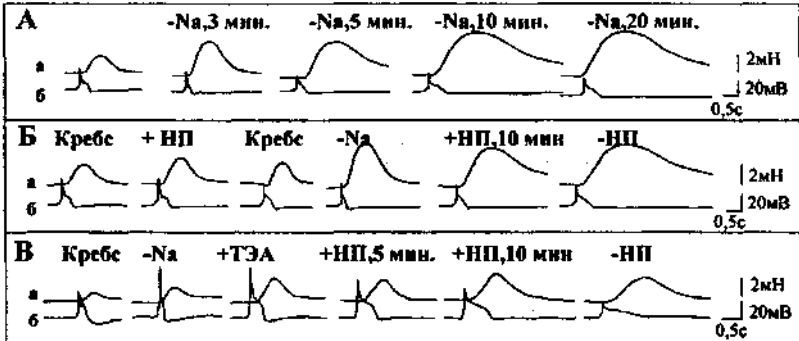


Рис.8 Влияние нитропрусида натрия на сокращения и потенциал действия ГМК мочеточника морской свинки в безнатриевых растворах.

А - динамика ПД и сокращений в безнатриевом растворе.

Б - действие 100 мкМ нитропрусида натрия (+НП) в растворе Кребса и на фоне безнатриевого раствора (-Na)

В - действие 100 мкМ нитропрусида натрия (+НП) в безнатриевом растворе на фоне 5 мМ тетраэтиламмония (+ТЭА).

Остальные обозначения как на рис.3

Эти данные указывают на то, что изменения ПД, вызванные добавлением НП в безнатриевый раствор, обусловлены в первую очередь нарушениями калиевой проводимости мембраны ГМК.

3.4. Изучение роли изменений калиевой проводимости мембраны в механизмах действия оксида азота на электрогенез и сокращения ГМК.

В проведенных исследованиях использовались блокаторы калиевых каналов тетраэтиламмоний [Imaizumi Y. e.a., 1981] и глибенкламид [Mioshi H.e.a., 1994; Kubo M., e.a., 1994].

3.4.1. В ГМК аорты, предсокращенных гиперкалиевым (40 мМ) раствором, добавление 5 мМ ТЭА вызывало дополнительную деполяризацию мембраны и рост механического напряжения до величин $182 \pm 11\%$ и $190 \pm 8\%$ ($n=8; p<0,05$) соответственно от контрольных (КС1 40мМ) значений.

Действие нитропрусида натрия (10 мкМ, EC_{50}) на фоне ТЭА существенно ослабевало. Значения МП и МН ГМК составили $88 \pm 4\%$ и $79 \pm 5\%$ ($n=8; p<0,05$), от контрольных значений в гиперкалиевом (40 мМ) ТЭА-содержащем растворе.

Действие более высоких концентраций нитропрусида натрия (1мМ) на фоне ТЭА также существенно ослабевало. Снижение МП и МН ГМК составило лишь $59 \pm 7\%$ и $38 \pm 5\%$, против их значений $15 \pm 3\%$ и $14 \pm 1\%$ ($n=8; p<0,05$) для этой концентрации НП в отсутствии ТЭА.

Добавление 10 мМ тетраэтиламмония в раствор Кребса вызывало деполяризацию мембраны ГМК аорты и повышение МН до $171 \pm 7\%$ и $185 \pm 9\%$ ($n=8; p<0,05$) соответственно. Влияние нитропрусида натрия на ГМК в концентрациях 10-1000 мкМ в присутствии 10 мМ ТЭА ослабевало еще в большей степени, чем при действии 5 мМ. МП и МН ГМК при добавлении 10 мкМ НП (EC_{50}) на фоне 10 мМ ТЭА составляли $90 \pm 5\%$ и $87 \pm 5\%$ ($n=8; p<0,05$) соответственно, от контрольных значений.

Таким образом, присутствие ТЭА в растворах существенно снижало эффективность реполяризующего и расслабляющего действия НП.

Известно, что в указанных концентрациях ТЭА уменьшает потенциал-зависимую и кальций-активируемую калиевые проводимости мембраны ГМК [Benham С., Bolton Т., 1986]. Как указывалось выше (стр.8), нитропруссид натрия не изменял вольт-амперную характеристику мембраны ГМК аорты, а значит, он не оказывал влияния на потенциал-зависимую калиевую проводимость мембраны ГМК аорты. Следовательно, резкое ослабление тетраэтиламмонием реполяризирующих эффектов НП связано с блокированием Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов мембраны ГМК аорты.

Полученные данные указывают на то, что уменьшение МП при действии НП обусловлено повышением Ca^{2+} -активируемой калиевой проводимости мембраны.

В ГМК мочеточника добавление тетраэтиламмония (5 мМ) в раствор Кребса вызывало увеличение длительности плато ПД на $116 \pm 23\%$, и амплитуды сокращений ГМК мочеточника на $57 \pm 18\%$ ($n=17; p < 0.01$) относительно исходных значений в нормальном растворе Кребса.

НП в концентрации 100 мкМ 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 контрольных в присутствии ТЭА.

Нитроглицерин (100 мкМ) в присутствии 5 мМ тетраэтиламмония сохранял свое угнетающее влияние на ПД и сокращение ГМК мочеточника (Рис.9).

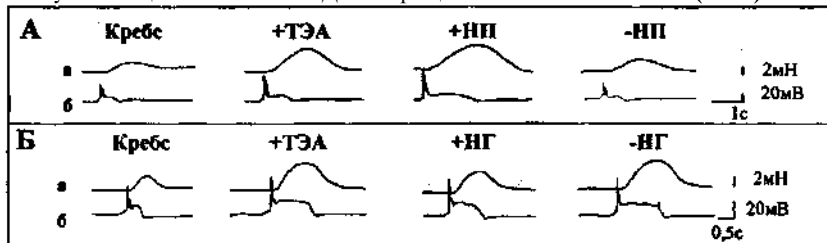


Рис.9. Влияние тетраэтиламмония на эффекты нитропруссида натрия и нитроглицерина на сокращения и потенциалы действия ГМК мочеточника морской свинки.

А - добавление 5 мМ тетраэтиламмония (+ТЭА) и на его фоне 100 мкМ нитропруссида натрия (+НП);

Б - то же, что А, но при добавлении 100 мкМ нитроглицерина.

Остальные обозначения как на рис 3.

Длительность плато ПД и величина сокращения уменьшились до $71 \pm 11\%$ и $74 \pm 14\%$ ($n=8; p < 0.05$) соответственно от контрольных в присутствии ТЭА.

Таким образом, действие НП на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника обусловлено снижением натриевой и кальциевой проводимости мембраны ГМК.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в ГМК мочеточника в условиях блокирования калиевых каналов тетраэтиламмонием оксид азота вызывал эффекты, противоположные тем, которые характерны для ГМК аорты.

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 [Баскаков М.Б., с соавт., 1987-1988].

В следующей серии экспериментов изучалась роль АТФ-чувствительной компоненты калиевой проводимости мембраны ГМК в механизмах действия оксида азота на ГМК аорты и мочеточника.

3.4.2. Блокатор АТФ-чувствительных калиевых каналов глибенкламид в концентрации 100 мкМ вызывал деполяризацию мембраны ГМК аорты и рост механического напряжения до $54 \pm 4\%$ и $55 \pm 3,5\%$ ($n=6; p<0,05$) соответственно от контрольных значений в гиперкалиевом растворе.

Добавление 10 мкМ НП уменьшало вызванное глибенкламидом МН до $65 \pm 5\%$ и снижало МП до $78 \pm 7\%$ ($n=6; p<0,05$) от контрольных значений в присутствии глибенкламида.

Таким образом, блокатор АТФ-зависимых калиевых каналов глибенкламид в большей степени ослаблял **реполярирующий** мембрану эффект НП, чем его **релаксирующее** действие. Это свидетельствует о том, что изменения МП при действии НП могут быть обусловлены активацией АТФ-чувствительной компоненты калиевой проводимости мембраны ГМК аорты.

3.5. Влияние оксида азота на внутриклеточные депо ионов кальция гладких мышц исследовалось с помощью активатора его высвобождения кофеина [Григорьев М., с соав., 1995; Ganitkevich V., Isenberg G., 1992] и ингибитора Ca^{2+} -АТФ-азы саркоплазматического ретикулула (СПР) тапсигаргина [Murthy K., e.a., 1998-2000].

3.5.1. Кофеин в концентрации 0,6 мМ в бескальциевых растворах вызывал прирост МН до $113 \pm 5\%$, без изменений МП ГМК.

Предобработка ГМК НП не изменяла величину кофеин-индуцированного сокращения (Рис.7).

Полученные данные свидетельствуют о том, что НП не оказывает влияние на процессы высвобождения Ca^{2+} из кофеин-чувствительных внутриклеточных депо ГМК аорты.

3.5.2. Влияние тапсигаргина на изменения **электрогенеза** и сокращений ГМК изучалось на препаратах мочеточника.

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

В присутствии тапсигаргина активирующее действие **нитропруссид**а натрия на сокращения ГМК мочеточника снижалось. Если в отсутствии тапсигаргина амплитуда сокращений при действии НП возрастала до $130 \pm 7\%$ ($n=11; p<0,01$) относительно исходных значений в растворе **Кребса**, то на фоне действия ингибитора Ca^{2+} -АТФ-азы СПР амплитуда сокращения достоверно снижалась до $87 \pm 6\%$ ($n=6; p<0,05$) относительно контрольных значений (в присутствии 1 мкМ тапсигаргина) (Рис.10).

Известно, что внутриклеточные депо Ca^{2+} не играют столь значимой для сокращения ГМК мочеточника роли, которую выполняет его внеклеточный пул [Шуба М.Ф., Бурый В.А., 1984]. В этой связи, повышение сократительной активности **тапсигаргином** могло быть связано с увеличением внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция вследствие угнетения процессов их депонирования в СПР.

Важным является и тот факт, что в присутствии ингибитора Ca^{2+} -АТФ-азы СПР снижалось активирующее действие НП на сокращения ГМК мочеточника. Эти данные можно рассматривать как свидетельство **того**, что в активации сократительного ответа ГМК **мочеточника** при действии НП участвует и Ca^{2+} , депонированный в СПР, количество которого **увеличивается** вследствие стимуляции нитропруссидом натрия кальциевого насоса СПР (Рис.10.Б).

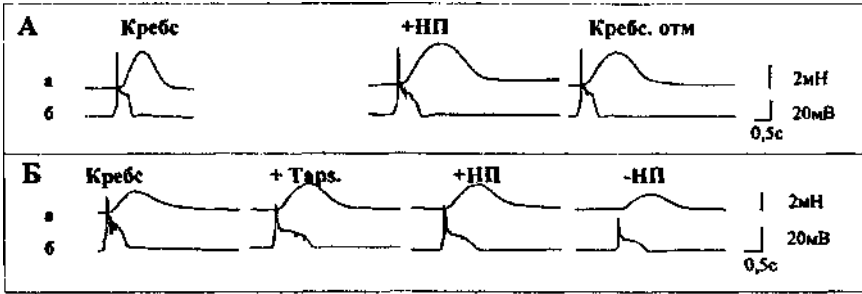


Рис. 10. Влияние тапсигаргина на эффекты нитропрусида натрия на сокращение (а) и потенциалы действия (б) мочеточника морской свинки:

А - действие 100 мкМ нитропрусида натрия (+НП) в растворе Кребса;
 Б - то же, что А, но на фоне действия 1 мкМ тапсигаргина (+Taps)
 Справа — калибровочный сигнал и отметка времени.

3.6. Изучение влияния оксида азота на электрические и сократительные свойства гладких мышц, активированных биологически активными веществами (БАВ).

В соответствии с классической схемой возбуждающее действие агонистов рецепторов 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 кальция из внутриклеточного депо [Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г., 1988]. В последнее время в эту схему в качестве важного компонента включена протеинкиназа С (ПК-С), активация которой обусловлена входом ионов кальция в результате воздействия миметиков на рецепторы мембраны ГМК (α_1 , H_1 , M|И др.), стимуляцией G-белков и фосфолипазы С [Lee M., Severson D., 1994; Somlyo A.P., Somlyo A.V., 1994].

3.6.1. Для исследования влияния оксида азота на изменения МП и МН на ГМК аорты, вызванные стимуляцией α_1 -адренэргических рецепторов, применяли фенилэфрин (ФЭ) и норадrenalин (НА) как в качестве самостоятельного предсокращающего фактора, так и совместно с гиперкалиевыми растворами.

Добавление 1 мкМ фенилэфрина (ФЭ) в присутствии 1 мкМ блокатора Р-адренэргических рецепторов пропранолола вызывало деполяризацию мембраны ГМК до $138 \pm 4\%$ ($n=8; p<0,05$). Величина деполяризации мембраны в этих условиях соответствовала той, которую наблюдали в растворе с 60 мМ хлорида калия, а МН ГМК достигало значения $170 \pm 4\%$ ($n=8; p<0,05$), что было больше на 30% (Рис.6;4).

Нитропруссид натрия (10 мкМ), добавленный на фоне ФЭ, вызывал реполяризацию мембраны до $50 \pm 4\%$ и снижение МН ГМК до $16 \pm 3\%$ ($n=8; p<0,05$) от контрольных значений. Увеличение концентрации НП до 100 мкМ приводило к полному ослаблению гладкомышечного препарата и снижению величины МП до $45 \pm 3\%$ ($n=8; p<0,05$).

При добавлении 40 мМ хлорида калия на фоне действия 1 мкМ ФЭ регистрировалась дополнительная деполяризация мембраны, которая суммарно составила $168 \pm 3\%$ ($n=8; p<0,05$). Увеличения МН ГМ при этом не происходило. НП (ЮмкМ) в этих условиях вызывал снижение МП и уменьшение МН ГМК до $50 \pm 3\%$ и $45 \pm 5\%$ соответственно ($n=8; p<0,05$) относительно контрольных значений в гиперкалиевом (40 мМ) растворе.

Как следует из приведенных данных, изменения МП при действии НП в присутствии ФЭ и КС1 не отличались от тех, которые наблюдали при добавлении НП в раствор, содержащий только ФЭ или КС1, но релаксирующий эффект НП при этом варианте **предсокращения (ФЭ+КС1)** был достоверно меньше, чем в присутствии только фенилэфрина. Следовательно, при одинаковых **реполяризирующих** эффектах НП проявлял более сильное **релаксирующее** действие на **фенилэфрин-индуцированное**, чем на индуцированное деполяризацией мембраны сокращения гладких мышц аорты.

3.6.2. В следующей серии экспериментов ГМК аорты предсокращались норадренином (НАЛ мкМ) в присутствии 1 мкМ пропранолола.

Нитросоединения (НГ и НП) вызывали зависимое от концентрации расслабление таких препаратов. При действии 10 мкМ **нитропруссид** натрия МН ГМК аорты снижались до значений **10±4%** (n=8; p<0,05) от контрольных (**Рис.11**).

Следует отметить, что в этом случае НП более эффективно расслаблял ГМК, чем НГ. В гиперкалиевых растворах соотношение расслабляющего действия НП и НГ было обратным. Совместное применение НП (**1 мкМ**) и НГ (**1мкМ**) вызывало полное расслабление гладких мышц аорты, **предсокращенных норадренином**.

Сравнения эффектов донора оксида азота при использовании различных **адреномиметиков** показало, что при одних и тех же концентрациях фенилэфрина и **норадренина** (1 мкМ) добавление в раствор 10 мкМ НП вызывало снижение МН ГМК аорты до сходных значений: **16±3%** (n=8; p<0,05) - для ФЭ и **10±4%** (n=8; p<0,05) - НА.

Рис. 11. Влияние нитроглицерина и нитропруссид натрия на механическое напряжение ГМК аорты, предсокращенных норадренином.

По оси абсцисс- логарифм концентрации нитросоединения в моль/л;

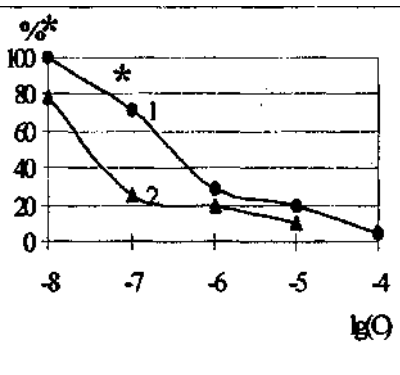
По оси ординат- за 100% взяты значения механического напряжения при добавлении 1 мкМ норадренина в присутствии 1 мкМ пропранолола.

Кривые:

1 - действие нитроглицерина,

2 - нитропруссид натрия.

Остальные обозначения как на рис.2.



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, независимые от изменения МП.

3.6.3. Исследование влияния НП на рецептор-управляемый вход ионов кальция в ГМК аорты в условиях инактивационного выключения быстрого потенциал-зависимого входа ионов кальция.

Для изучения **рецептор-управляемого** входа ионов кальция фенилэфрин добавлялся на фоне действия раствора, содержащего 120 мМ хлорида калия (с.12). Ранее

считалось, что прирост МН в ответ на действие ФЭ в этих условиях обеспечивается исключительно открыванием **рецептор-управляемых** кальциевых каналов [Ходоров Б.И., 1975]. В последние десятилетия убедительно показано, что кроме этого α_1 -**адреномиметики** включают сигнальный путь, опосредованный активацией метаболизма мембранных **фосфоинозитидов**, который и обеспечивает генерацию мышцей поддерживаемого сокращения [Berridge M., 1984; Park S., Rasmussen H., 1985; Lee M., Severson D., 1994; Somlyo A.P., Somlyo A.V., 1994].

ФЭ (1мкМ) на фоне 120 мМ КСl вызывал повышение механического напряжения до $201 \pm 6\%$ ($n=8; p<0,05$) от контрольных значений при неизменном МП. В этих условиях НП в концентрациях 10 - 1000 мкМ не влиял на величину МП и МН ГМК аорты (Рис.6, 5).

Полученные данные указывают на то, что расслабляющие эффекты NO на гладкие мышцы, **предсокращенные** ФЭ, не связаны с угнетением рецептор-управляемого входа ионов кальция в ГМК аорты крысы.

В условиях перегрузки цитозоля ионами кальция оксид азота не влияет и на сигнальный каскад, связанный с гидролизом мембранных фосфоинозитидов.

3.6.4. Влияние NO на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника на фоне БАВ изучалось в присутствии гистамина и фенилэфрина. (Рис.12).

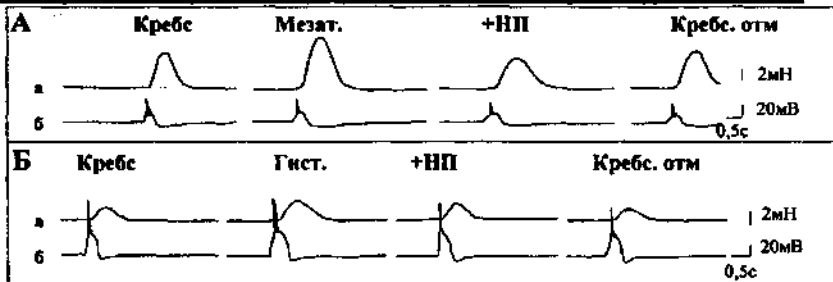


Рис.12 Влияние 100 мкМ нитропрусида натрия (+НП) на сокращения и потенциалы действия ГМК мочеточника морской свинки в присутствии биологически активных веществ:

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

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

Остальные обозначения как на рис.3

Добавление в раствор Кребса 10 мкМ мезатона (фенилэфрина) 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 исходных значений в растворе Кребса. На фоне ФЭ НП (100 мкМ) вызывал снижение амплитуды сокращения ГМК до исходных значений в отсутствии БАВ (Рис.12,А).

Подобный эффект был получен и при использовании 10 мкМ гистамина. Его применение вело к увеличению длительности плато ПД и амплитуды 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.12,Б).

Эти данные подтверждают, что в ГМК мочеточника, так же 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. Таким образом, дополнительная деполяризация мембраны ГМК и, следовательно, повышение входящего потока Ca^{2+} , ослабля-

ло реализацию эффектов NO, тогда как активация рецепторов, сопряженных с метаболизмом **фосфоинозитидов** усиливало эти процессы.

Известно, что в последнем случае происходит активация обеих ветвей кальциевой сигнальной системы: **-кальмодулин-зависимой** и С-киназной [Park S., Rasmussen H., 1985; Somlyo A.P., Somlyo A.V., 1994]. 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 угнетает метаболизм мембранных **фосфоинозитидов** [Реутов В.П., Орлов С.Н., 1993; Murthy K., et al., 2000].

3.6.5. Исследование роли изменений калиевой проводимости мембраны ГМК в механизмах действия оксида азота на активированные БАВ гладкие мышцы.

В первой серии экспериментов изучался вклад изменений калиевой проводимости мембраны ГМК в реализацию действия НП на **фенилэфрин-индуцированную** активацию гладкой мышцы аорты.

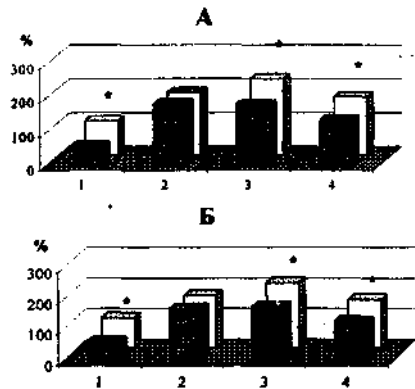
На фоне действия **10 мМ ТЭА**, добавление **1 мкМ ФЭ** вызывало прирост МП до **214±8%** и МН до **226±7%** от контрольных значений в гиперкалиевом (40 мМ) растворе. Добавление НП в концентрации 10 мкМ приводило к снижению МП и МН этих величин до **179±5%** и **184±7%** ($n=7$; $p<0,05$) соответственно (**Рис. 13,3**).

Добавление 10 мМ ТЭА в присутствии ФЭ (1 мкМ) вызывало прирост МП и МН до величин 160±5% и 172±7% ($n=7$; $p<0,05$). Нитропруссид натрия (10 мкМ) на этом фоне вызывал снижение МП и МН до **130±5%** и **139±6%** соответственно ($n=7$; $p<0,05$) от контрольных значений в гиперкалиевом (40 мМ) растворе (**Рис. 13,4**).

Рис.13. Влияние нитропруссид натрия на механическое напряжение (А) и мембранный потенциал (Б) ГМК аорты, предсокращенными различными факторами:

- 1 – 40мМ хлорида калия;
- 2 – 10мМ тетраэтиламмония;
- 3 – ЮмМ тетраэтиламмония и 1 мкМ фенилэфрина;
- 4 – 1 мкМ фенилэфрина и ЮмМ тетраэтиламмония.

Остальные обозначения как на рис.6



Поскольку присутствие в растворе 10 мМ 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. Гиперкалиевая контрактура обеспечивается притоком кальция извне по **неинактивирующимся** кальциевым каналам **плазмалеммы**. Поддерживаемое сокращение при действии ФЭ обеспечивается оперированием С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы. В первом случае **реполяризация** и снижение МН может быть достигнута за счет угнетения кальциевой или (и) активации калиевой проводи-

мостей мембраны ГМК. Во втором - действие соединений, оказывающих реполяризующее 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 деполаризацией 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.

В ГМК мочеточника оксид азота вызывает реакции противоположные тем, которые развиваются в ГМК **аорты**.

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 сосудистых ГМК. Включение этого пути передачи внутриклеточных сигналов ведет к угнетению электрической и сократительной активности за счет увеличения калиевой проводимости мембраны вследствие стимуляции натрий-протонного обмена.

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

Хорошо известно, что стимуляция **α_1 -адрено-** и **H_1 -гистаминэргических** рецепторов мембраны ведет к активации С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы [Raasmussen H, 1982; Berridge M., 1984; Lee M., Severson D., 1994].

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** [Fan J., Вугон К., 2001; Coats P., e.a., 2001]

4.1.ФМА, в концентрации 0,5 мкМ к 25мин. необратимо снижал амплитуду, длительность плато ПД и силу сокращений ГМК мочеточника до величин **89±7%, 77±9% и 69±11% (n=6;p<0,05)** соответственно, относительно исходных в растворе Кребса (Рис.14,Б).

При увеличении концентрации ФМА до 1 мкМ угнетающий эффект нарастал до величин **80±7%, 70±7% и 45±9% (n=6;p<0,05)** соответственно (Рис.14,Б).

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

После предобработки ГМК **форболовым** эфиром НП вместо стимуляции сокращений вызывал их угнетение.

4.2.Кальфостин С в концентрации **0,1мкМ** на 5-7 мин. действия вызывал усиление сокращений ГМК мочеточника до **110±9% (n=6;p<0,05)** относительно исходных значений. Добавление на фоне **кальфостина С** НП (100 мкМ) не приводило к характерной для мочеточника активации сокращения при действии оксида азота (Рис.14,В).

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

4.3.БАВ на фоне действия кальфостина С (**0,1мкМ**) продолжали оказывать активирующее действие на ПД и сокращения ГМК мочеточника (Рис.14,Г,Д).

Гистамин (10 мкМ) на фоне кальфостина С увеличивал длительность плато ПД и амплитуду сокращений на **43±7% и 63±11%** соответственно (Рис.14,Г). Подобный эффект был характерен и для мезатона (Рис.14,Д), добавление которого после **каль-**

фостина С, вызывало увеличение длительность 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 БАВ не оказывал никакого влияния на ПД и сокращения ГМК мочеточника. Следовательно, угнетение С-киназной ветви кальциевой регуляции кальфостинном С ослабляло эффекты донатора оксида азота - нитропруссида натрия на ГМК мочеточника (Рис.14,Г,Д).

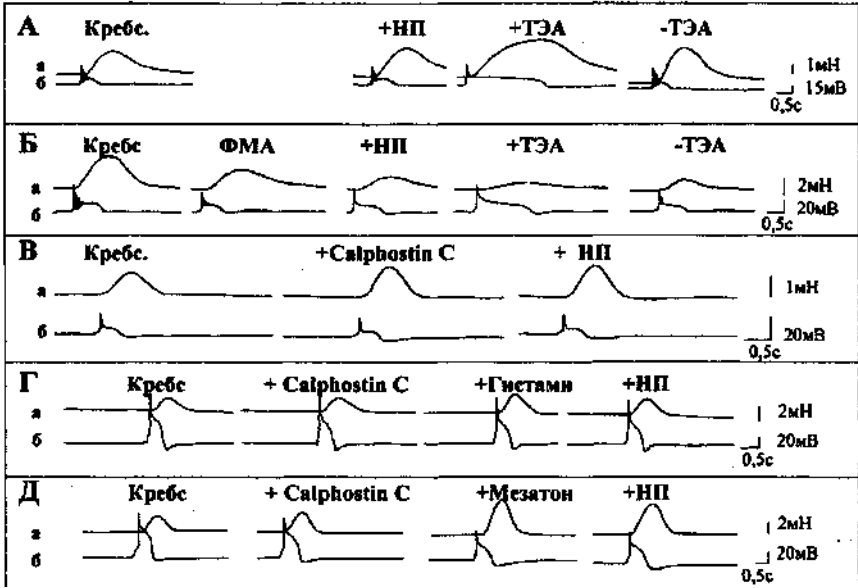


Рис. 14. Влияние активности протеинкиназы С и нитропруссида натрия на сокращения (а) и потенциалы действия (б) ГМК мочеточника морской свинки: А-действие 100 мкМ нитропруссида натрия (+НП) и 5 мМ тетраэтиламмония (+ТЭА); Б - тоже, что А, но на фоне 1 мкМ активатора ПК-С форболового эфира (+ФМА); В - 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

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 [Реутов В.П., Орлов С.Н., 1993; Murthy K., e.a., 1998, 1999], одного из ключевых ферментов фосфоинозитидного обмена [Lee M., Severson D., 1994]. Показано также снижение митогенной активности ПК-С при действии НП на изолированные ГМК простаты [GuhJ., e.a., 1998].

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

5.1. Для активации аденилатциклазы использовался β -алдреномиметик изадрин.

В концентрациях 1-10 мкМ он не вызывал значительных изменений ПД и сокращений ГМК мочеточника. Действие 100 мкМ НП на фоне изадрина практически не отличалось от контроля без изадрина.

Эффекты на уровне вторичных мессенджеров (цАМФ и цГМФ) можно воспроизвести не только, активируя их синтез, но и угнетая ферменты, обеспечивающие их деградацию.

5.2.В следующих экспериментах использовались ингибиторы фосфодиэстераз 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX) и винпоцетин [Медведева М.В. 1995; Jiang H.,e.a.,1993; Kiss B; Karpati E. 1996].

5.2.1. IBMX в концентрации 10 мкМ уменьшал продолжительность плато потенциала действия (ПД) до $68 \pm 11\%$ ($n=6; p<0,05$) и амплитуду сокращений ГМК до $56 \pm 8\%$ и от исходных значений в нормальном растворе Кребса (Рис.15,А).

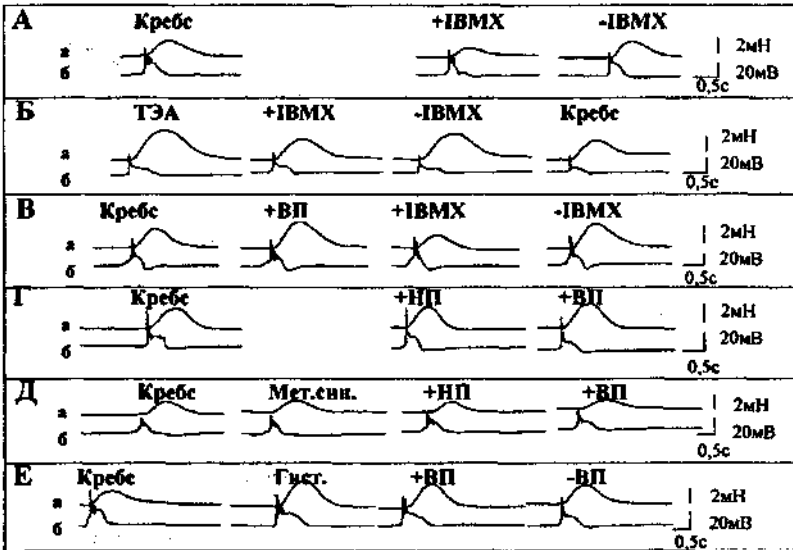


Рис. 15. Влияние нитропруссид натрия и ингибиторов фосфодиэстеразы на сокращения и потенциалы действия ГМК мочеточника морской свинки

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

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 винпоцетина (+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 IBMX 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.15,Б).

Полученные данные указывают на то, что эффекты IBMX обусловлены повышением калиевой проводимости мембраны ГМК.

5.2.2. 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. 15, В**).

IBMX (10 мкМ) на фоне **винпоцетина** снижал длительность плато и амплитуду сокращений ГМК до $68 \pm 8\%$ и $56 \pm 8\%$, ($n=6; p<0,05$) соответственно, что свидетельствует о различии внутриклеточных мишеней, используемых этими соединениями.

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

На фоне усиления сокращения ГМК мочеточника 100 мкМ НП на $30 \pm 7\%$ ($n=11; p<0,01$) добавление 1 мкМ ВП вызвало 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. 15, Г, Д**).

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

Эти данные дают основания полагать, что стимулирующее влияние ВП, также как и НП, на сокращения ГМК мочеточника обусловлено увеличением внутриклеточной концентрации цГМФ. В случае действия НП, это достигается активацией растворимой фракции ГЦ (**стр. 11**), а при действии ВП - **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 (**стр. 20**).

5.2.4. На фоне 10 мкМ фенилэфрина и, особенно, гистамина активация сокращения ГМК винпоцетином сменялось на противоположное: происходило угнетение сокращений и укорочение плато ПД. (**Рис. 15, Е**).

Таким образом, применение БАВ приводило к исчезновению активирующего сокращения ГМК мочеточника действия **винпоцетина**, как и в случае с **нитропруссидом натрия** (**стр. 20, рис. 12**). Можно предположить, что эффекты обоих препаратов 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, как указывалось выше (**стр. 11**), оксид **азота**, используя в качестве вторичного посредника цГМФ, уменьшает натриевую и кальциевую проводимости 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**.

В **интактных** ГМК доминируют эффекты ослабления угнетающего влияния ПК С на ПД и сокращения. В условиях активации **гистамином** натриевой проводимости и снижения кальциевой 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 [Berridge M., 1984; Lee M., Severson D., 1994]. **Винпоцетин**, ингибируя преимущественно ФДЭ I-го типа, использующие в качестве субстрата цГМФ [Солнцева Е.И., Буканова Ю.В., 1998; Kiss B; Karpati E., 1996], обес-

печивает еще больший прирост содержания этого ЦН в клетке. Поскольку сродство наиболее активной ФДЭ к цГМФ примерно на порядок выше, чем к цАМФ [Barnes P., 1995], фермент «переключается» на гидролиз циклического гуанозинмонофосфата. Следствием этого может быть накопление в клетках цАМФ, который, как известно, угнетает ПД и сокращения ГМК мочеточника [Баскаков М.Б., 1988].

Влияние IBMX на ПД и сокращение, вероятно всего, опосредовано повышением внутриклеточной концентрации цАМФ [Jiang H., e.a., 1993]. Этот циклический нуклеотид, угнетает электрическую и сократительную активность ГМК за счет повышения калиевой проводимости мембраны [Kurokawa Y., e.a., 1998; Okogbule-Wonodi A., e.a., 1998] и, потому, присутствие ТЭА снижает его эффекты (Рис.15,Б).

5.3. Дальнейший анализ действия циклических нуклеотидов на электрические и сократительные свойства ГМК проводился с использованием проникающих аналогов цАМФ и цГМФ (Рис.16).

Добавление **дибутирил-цАМФ** (10 мкМ) вызывало, подобно IBMX, угнетение сокращения ГМК, тогда как **дибутирил-цГМФ** (100 мкМ и 500 мкМ), также как НП и ВП, активировал сокращения ГМК мочеточника

Следует отметить, что эффекты **дибутирил-цАМФ**, но не **цГМФ** изменяли свою **миогенную** направленность при 10-ти кратном увеличении концентрации. Применение 100 мкМ дибутирил - цАМФ усиливало сокращение ГМК мочеточника при снижении длительности плато ПД (Рис.16, А и Б).

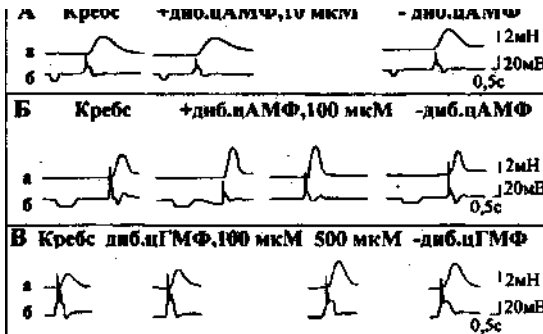


Рис.16. Влияние проникающих аналогов циклических нуклеотидов на сокращения (а) и потенциалы действия (б) ГМК мочеточника морской свинки.

А - действие 10 мкМ дибутирил-цАМФ

Б - действие 100 мкМ дибутирил-цАМФ

В - действие 100 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 **гладкомышечных** клетках 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 потенциала действия и угнетает сокращение за счет активации калиевой проводимости мембраны, а цГМФ усиливает сокращения гладкомышечных клеток, снижая 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 оксида азота на $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт в ГМК мочеточника

В последние годы активно обсуждается роль и место $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта в сократительных реакциях гладких мышц на действие физических факторов (осмо-

тическое давление), химических и биологически активных веществ. Показано, что в ГМК аорты выключение $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта существенно изменяло эффективность действия нитросоединений [Акаг F., е.а. 1999,2001].

Влияние модуляции $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта на сопряжение возбуждения-сокращения в гладкомышечных клетках, а также действие оксида азота на эти процессы не изучалось.

Для выключения $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта использовался буметанид [Orlov, S., е.а. 1996; Акаг F., е.а. 1999,2001]

6.1. Добавление буметанида в концентрации 10 мкМ в раствор Кребса на 8-10 мин. приводило к гиперполяризации мембраны и снижению силы сокращений до $83 \pm 12\%$ ($n=9$; $p<0.05$) относительно исходных значений в растворе Кребса. Параметры ПД при этом практически не изменялись.

В более высоких концентрациях (50–100 мкМ) буметанид не изменял электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника (Рис.17).

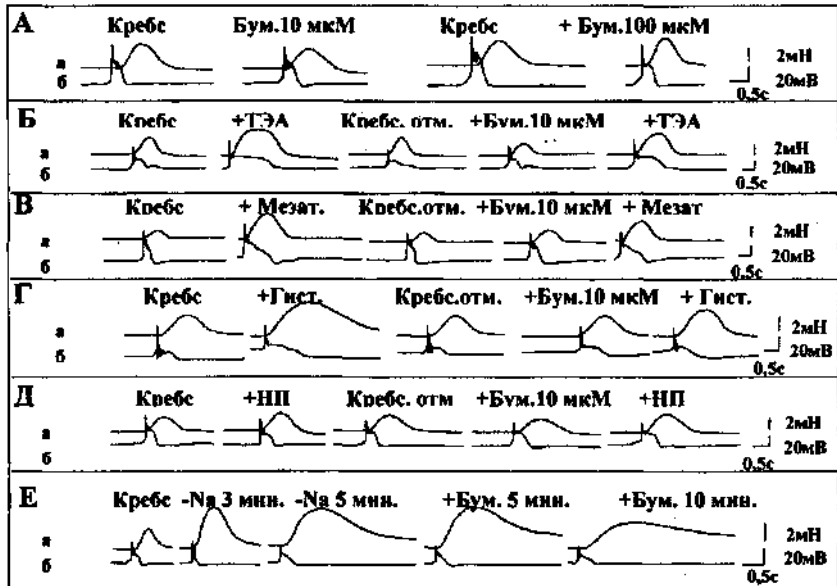


Рис. 17. Влияние биологически активных веществ и буметанида на сокращения (а) и потенциалы действия (б) ГМК мочеточника морской свинки:

А - 12-15 мин. после добавления 10 мкМ и 100 мкМ буметанида (+Бум.);

Б - то же, что А, но после добавления 5 мМ тетраэтиламмония (+ТЭА);

В - то же, что А, но после добавления 10 мкМ мезатона (+Мез.);

Г - то же, что А, но после добавления 10 мкМ гистамина (+Гис.);

Д - то же, что А, но после добавления 100 мкМ нитропруссид натрия (+НП);

Е - то же, что А, но в безнатриевом растворе (-Na).

Остальные обозначения как на рис.3.

6.2. Исследования механизмов гиперполяризационного действия буметанида на мембрану ГМК мочеточника проводили с использованием блокатора калиевых каналов (ТЭА) и безнатриевых растворов.

Предобработка буметанидом (10 мкМ) вызвала снижение активирующего электрическую и сократительную активность ГМК эффекта 5 мМ ТЭА (Рис17,Б).

На фоне угнетения калиевой проводимости мембраны (ТЭА, 5мМ) добавление 1-0 мкМ **буметанида** приводило к снижению длительности плато ПД и сокращений ГМК мочеточника до значений **80±16%** и **76±18** (n=6; p<0.05), и этот эффект усиливался при увеличении концентрации буметанида до 50-100 мкМ в растворе с ТЭА.

Так как **буметанид** продолжал оказывать свое угнетающее влияние на ПД и сокращения ГМК мочеточника и в безнатриевых растворах (**Рис17,Д**), можно предположить, что основную роль в гиперполяризации мембраны ГМК играют нарушения процесса перераспределения ионов хлора при угнетении **буметанидом** механизмов оперирования **Na⁺,K⁺,2Cl⁻-котранспорта**. Имеются сведения о способности буметанида играть роль антагониста хлорной проницаемости мембран в клетках эпителии, эритроцитах и ГМК культуры аорты [Gillen C., Bliss F.,1999; Adragna N.е.а.,2000].

В ГМК внутриклеточная концентрация ионов хлора существенно превышает ту, которая следует из расчетной в условиях пассивного распределения этих ионов через мембрану. Неравновесное распределение хлора в основном поддерживается переносом этих анионов через **Na⁺,K⁺,2Cl⁻-котранспорт**. Его ингибирование буметанидом ведет к уменьшению внутриклеточной концентрации ионов хлора и как следствие к снижению входящего хлорного тока через мембрану. Эти процессы и обуславливают гиперполяризацию мембраны при действии буметанида.

6.3.Предобработка гладкомышечных препаратов буметанидом (10 мкМ) ослабляло активацию сокращений ГМК мочеточника нитропруссидом натрия. В этом случае, добавление 100 мкМ **нитропрussaида** натрия увеличивало амплитуду сокращения до **111 ±7%**, тогда как в отсутствии буметанида прирост сокращения при действии НП составлял величину **130±9%** (n=11; p <0,05) относительно исходных в растворе **Кребса**. Следует отметить, что на фоне **нитросоединения** буметанид вызывал так же снижение и электрической активности ГМК мочеточника. Амплитуда и длительность плато ПД, составляли **78±15%** и **79±16%** (n=6; p<0.05) соответственно, относительно контрольных значений в присутствии 100 мкМ НП (**Рис.17,Е**).

Увеличение концентрации буметанида в растворе до 100 мкМ на фоне НП приводило к еще большему угнетению сократительного ответа ГМК **мочеточника**. Амплитуда сокращений при этом снижалась до **56±10 %** (n=6; p<0.05) относительно контрольных эффектов НП. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что одним из эффекторов оксида является **Na⁺,K⁺,2Cl⁻ - котранспортер**.

6.4.Предобработка препаратов буметанидом (10 мкМ) достоверно снижала активизирующий эффект 10 мкМ гистамина и мезатона на ПД и сокращения ГМК мочеточника (Рис.17,В-Г).

Относительно эффектов БАВ в растворе **Кребса**, на фоне 10 мкМ буметанида амплитуда и длительность плато ПД ГМК мочеточника после действия мезатона достигали значений **82±12%** и **79±16%** (n=6; p<0.05); а после гистамина **73±14%** и **76±11%** соответственно.

6.5.Угнетающие эффекты буметанида на фоне БАВ (10 мкМ), были значительно сильнее **выражены**, чем в **интактных** ГМК. Так, при действии 10 мкМ буметанида на фоне **гистамина**, амплитуда и длительность плато ПД ГМК мочеточника снижались до значений **79±14%** и **64±8%** (n=9; p<0.01), а на фоне мезатона - до **86±13%** и **76±8%** (n=8; p<0.01) соответственно. Угнетение электрических и сократительных свойств ГМК мочеточника на фоне БАВ усиливалось при увеличении концентрации ингибитора **Na⁺,K⁺,2Cl⁻-котранспорта** в растворе до 50 и 100 мкМ.

Полученные данные указывают на то, что одним из компонентов влияния стимуляции **α₁-адрен-** и **H₁-гистаминэргических** рецепторов мембраны ГМК мочеточника

является модуляция хлорных токов, величина которых зависит от электрохимического потенциала этих анионов, создаваемого $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспортом. Увеличение вклада хлорных токов в электрогенез ГМК при действии БАВ и обуславливает большую чувствительность электрической и сократительной активности к действию ингибитора $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта - буметанида.

Полученные результаты дают основания предположить, что более сильное влияние оксида азота в присутствии БАВ (стр.10) обусловлено, по крайней мере, частично, уменьшением деполяризирующего хлорного тока вследствие ингибирования ПК-С и деактивации $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта.

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: диацилглицерол и инозитолтрифосфат [Баскаков М.Б. с соавт., 1988-2001; Ткачук В.А., 1998; 1994; Kuriyama H., e.a., 1998].

К настоящему времени накоплено большое количество данных об участии оксида азота в поддержании постоянного баланса физиологических и патологических процессов в самых различных биологических объектах [Реутов В.П., Орлов С.Н., 1993; Марков Х.Ф., 1996; Малышев И.Ю., Малышева Е.В., 1998; Brune V., 1997; Bundy R., 1999; Taylor B., 1997]. Выяснение значимости, особенностей оперирования и функциональных проявлений этих процессов, открывает новые перспективы понимания механизмов регуляции клеток, органов и систем.

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 соавт., 2001; Поленов М.А., 1998; Ignarro L., e.a., 1999; Ekerhovd E., e.a., 1998, 1999; Denninger J., Marietta M. 1999; Shibata C., e.a., 1998; Vanhoutte P., 1998] играют нарушения синтеза и/или эффекторных механизмов сигнального пути, опосредованного оксидом азота и 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.

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. Таким образом, проблема регуляции сокращения ГМК является, в сущности, проблемой метаболизма внутриклеточного кальция. [Баскаков М.Б. с соавт., 1988-2001; Ткачук В.А., 1998; Somlyo A.P., Somlyo A.V., 1994; Kuriyama H., e.a., 1998].

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 [Furchgott R., Vanhoutte P., 1989; Luscher T., 1989; Moncada S., 1992]. Проведенные исследования показали, что, несмотря на ряд принципиальных различий в механизмах сопряжения возбуждения-сокращения в ГМК сосудов, ЖКТ и мочеоточника, мишенью для NO в этих мышцах является растворимая фракция ГЦ.

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 кальция. 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.

Из экспериментов с **блокаторами** калиевых каналов и **анализа**, полученных вольт-амперных характеристик мембраны изучаемых ГМК следует, что оксид азота модулирует два компонента калиевой проводимости мембраны – **кальций-активируемую** и **АТФ-чувствительную**. Эти данные еще раз подтверждают точку зрения **М.Ф.Шубы** (1984) о том, что в гладких мышцах изменения калиевой проводимости, в отличие от других электровозбудимых структур, играют доминирующую роль в реализации различных **регуляторных** воздействий.

Другим фактором, влияющим на потенциал-зависимый вход ионов кальция, являются хлорные токи, смещающие МП ГМК в сторону деполяризации мембраны. Принципиальным отличием ГМК от других электровозбудимых структур является наличие высокого электрохимического потенциала для ионов **хлора**, направленного наружу. Неравновесное распределение ионов хлора в ГМК в **основном** поддерживается переносом этих анионов посредством $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -**котранспорта**. Так как ингибирование **буметанидом** этого **котранспорта** в ГМК мочеточника ведет к снижению эффектов 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 [Шуба М.Ф., Бурый В.А., 1984]. Как указывалось выше, в присутствии ингибитора Ca^{2+} -АТФ-зы 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 **нитропруссидом** натрия кальциевого насоса СПР. Повышенная **предзагрузка ретикулума** Ca^{2+} повышает значимость этой фракции в обеспечении сокращений ГМК мочеточника (стр. 17).

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** [Barnes P., 1995], что отражается соответствующим изменением сократительных реакций ГМК **мочеточника**, уже характерным для этого циклического нуклеотида и, по-видимому, стимулируемых NO **процессов** (с.26).

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 **Ca²⁺** в генерацию сокращений изучаемой гладкой мышцы.

Проведенные **исследования** указывают на особую роль С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы 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-киназой [Rasmussen H., 1982; Berridge M., 1984; Lee M., Severson D., 1994; Somlyo A.P., Somlyo A.V., 1994].

Более выраженное влияние НП на индуцированное **БАВ** сокращения гладких мышц аорты, чем на вызванное хлоридом калия обусловлено, прежде всего, их различной природой. Гиперкалиевая контрактура обеспечивается притоком кальция извне по **неинактивирующимся** кальциевым каналам **плазмалеммы**. Поддерживаемое сокращение при действии **агонистов α_1 -адренэргических** и **H₁-гистаминэргических** рецепторов обеспечивается оперированием С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы. В первом случае реполяризация и снижение МН может быть достигнута за счет угнетения кальциевой или (и) активации калиевой **проводимостей** мембраны ГМК. Во втором - проявляются **эффекты** нитропрусида 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 оксида азота на контрактуру гладких мышц аорты, вызванную деполаризацией 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 М.Б.Баскакова с соавт. (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 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. Оксид азота снижает индуцированную БАВ активность **протеинкиназы С** и таким образом «всвобождает» ГМК мочеточника от тормозящего влияния последней. Этот механизм, наряду с увеличением **предзагрузки** кальцием СПР, обеспечивает стимуляцию оксидом азота сократительной активности ГМК мочеточника.

ВЫВОДЫ

1. Оксид азота вызывает дозозависимое расслабление и **реполяризацию** мембраны ГМК аорты крысы, мочеочника и *taenia coli*, **предсокращенных** гиперкалиевыми растворами. Эти эффекты обусловлены активацией растворимой фракции **гуанилатциклазы**.
2. Влияние оксида азота на гладкие мышцы опосредуется потенциал-зависимыми и потенциал-нечувствительными механизмами, относительный вклад которых определяет направленность изменений сократительных реакций. Величина и направленность влияния оксида азота на ГМК имеет органную специфичность, зависит от **предсокращающего** агента и обусловлена особенностями регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц вторичными посредниками.
3. Расслабление ГМК аорты крысы при действии оксида азота обусловлено **реполяризацией** мембраны вследствие активации кальций-зависимого и **АТФ-чувствительного** компонентов калиевой проводимости мембраны.
4. Оксид азота осуществляет потенциал-независимый контроль **гладкомышечного** тонуса через изменение эффективности оперирования сигнальной системы, опосредованной метаболизмом мембранных **фосфоинозитидов**.
5. При субмаксимальных внутриклеточных **концентрациях** ионов кальция оксид азота осуществляет потенциал-независимый контроль сократительной активности ГМК через угнетение S-киназной ветви кальциевой сигнальной системы, независимо от особенностей механизмов ее оперирования в различных типах гладкой мускулатуры. **Ингибирование протеинкиназы С** ослабляет, а активация усиливает угнетающее действие донаторов оксида азота на потенциалы действия и сокращения ГМК мочеочника.
6. Влияние циклических **нуклеотидов** на электрическую и сократительную активность ГМК мочеочника зависит от изменений внутриклеточного соотношения **цГМФ/цАМФ**, индуцированных оксидом азота, и опосредуется преимущественно калиевой проводимостью в случае с **цАМФ**, а калиевой, натриевой и кальциевой **проводимостями** мембраны в случае с цГМФ.
7. В реализации эффектов оксида азота в **гладкомышечных** клетках мочеочника морской свинки принимает участие **Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ котранспорт**.
8. Нитроглицерин, но не **нитропруссид** натрия, **цГМФ-независимым** способом угнетает кальциевую проводимость мембраны ГМК мочеочника. Длительное действие **нитроглицерина**, в отличие от **нитропруссиды натрия**, сопровождается развитием толерантности ГМК, которая убывает в ряду: сосуды, *taenia coli*, мочеочник.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Исследование роли эпителия в регуляции сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей // Успехи физиол. Наук - 1994-Т.25, N1.-с.51-52 (Соавт. Капилевич Л. В., Медведев М. А., Баскаков М. Б., Петров Е. Ю., Кусков М. В.)
2. **Эпителиально-гладкомышечное** взаимодействие в регуляции тонуса воздухоносных путей // Физиол. ж. им.И.М.Сеченова 1995,-Т.81, N7,- с.99-105 (Соавт. Капилевич Л. В., Медведев М. А., Баскаков М. Б., Кусков М. В., Петров Е. Ю.)
3. Зависимая от эпителия регуляция сократительной активности гладких **мышц** воздухоносных путей // Бюлл.эксп.биол. и мед.-1995. Т. 119, N3 - с.283-286. (Соавт. Капилевич Л. В., Медведев М. А., Кусков М. В., Тимофеев В. Ю., Баскаков М. Б.)
4. Механизмы, обеспечивающие **резистентность** гладких мышц трахеи крысы к **гистамину** // Бюлл. эксп. биол. и мед.-1995.-Т121, N9, с.263-264. (Соавт. Капилевич Л. В., Медведев М. А., Кусков М. В., Баскаков М. Б.)

5. Эпителий-зависимый механизм **бронхорасширяющего** действия адреналина // **Экспер. и клин. фармак.-1995,-** Т.58,№1.-с.33-35. (Соавт. Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Петров Е. Ю., Медведев М. А.)
6. Механизмы регуляции **функции** гладких мышц вторичными посредникамию-**Монография,** Томск, 1996- СГМУ, Изд-во "Гавань".-153 с. (Соавт. Баскаков М. ., Капилевич Л. В., **Загулова** Д. В., Медведев М. А.)
7. Внутриклеточные сигнальные системы в эпителии и гладких мышцах воздухоносных путей // Пульмонология, 1997.-№2.-с.72- 76. (Соавт. Баскаков М. Б., Капилевич Л. В., Медведев М. А., Петров Е. Ю., **Анфиногорова** Я. Д.)
8. Влияние **нитропруссид** натрия на **гладкомышечные** полоски мочеточника и Taenia coli морской свинки // В сб. **Нейрогуморальные** механизмы регуляции органов пищеварительной **системы.-Томск,** СГМУ, 1997.- с. 155-156. (Соавт. Панов А. А., Баскаков М. Б., Попов А. Г., Медведев М. А.)
9. Исследование механизмов **релаксирующего** влияния нитропруссид на гладкомышечные клетки сосудов при различных **предсокращающих** факторах // Там же, **с.112-113.** (Соавт. Панов А. А., Баскаков М. Б.)
10. Влияние нитропруссид натрия на мембранный потенциал и механическое напряжение **гладкомышечных** клеток аорты крысы // Рос. Физиол. ж. им. И. М. Сеченова.- 1997-Т.83,№7,-с.70-76. (Соавт. Баскаков М. Б., Панов А. А., **Петров** Е. Ю., Медведев М. А., Капилевич Л. В.)
11. Исследование мембранных механизмов расслабления гладкомышечных клеток // Сб. резюме в ж. Пульмонология, - VII Национальный конгресс по болезням органов дыхания.- **Москва,** 1997, 2-5 июля, с. 53. (Соавт. Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А., Панов А. А., Петров Е. Ю.)
- 12.**Роль** кальциевой регуляции сократимости гладкомышечных клеток сосудов в **релаксирующем** влиянии нитропруссид натрия // В сб. Медико-биологические аспекты **нейро-гуморальной** регуляции - **Томск,** СГМУ, 1997-с.109-110.(Соавт. Баскаков М. Б., Панов А. А., Капилевич Л. В., Медведев М. А.)
13. Изучение калиевой проводимости гладкомышечных клеток сосудов в **релаксирующем** влиянии нитропруссид натрия. Там же, с.206-208 (Соавт. Баскаков М. Б., Панов А. А., Капилевич Л. В., Медведев М. А.)
14. Эффекты **нитросоединений** на мембранный потенциал и мышечное напряжение гладкомышечных клеток // **Тез.докл. XVII с. Всерос.** Физиол. Об-ва им. И. П. Павлова. Ростов-на-Дону, 1998. **с. 102.** (Соавт. Панов А. А., Попов А. Г., Медведев М. А.)
15. Влияние нитропруссид натрия на мембранный потенциал и мышечное напряжение гладких мышц аорты крысы // Там же, с. 136 (Соавт. Панов А. А., Баскаков М. Б., Капилевич Л. В., Петров Е. Ю., Попов А. Г., Анфиногорова Я. Д.)
16. Роль ионов кальция в **релаксирующем** действии нитропруссид натрия на ГМК аорты крысы // Сб. статей **II-го** Международного симпозиума «**Физико-химические основы функционирования белков и их комплексов**» - Воронеж, 1998.-с.107-111 (Соавт. Панов А. А., Баскаков М. Б., Попов А. Г., Капилевич Л. В., Медведев М. А.)
- 17.**Релаксирующий** эффект нитропруссид натрия в гладких мышцах: роль ионов кальция // Сб. резюме в ж. Пульмонология. 1998 г. «VIII Нац. конгресс по болезням органов дыхания» - Москва 22-24 октября, **XXI.** 7, с. 210 (Соавт: Панов А. А., Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А., Попов А. Г., Анфиногорова Я. Д.)
18. Исследование чувствительности гладкомышечных клеток к **нитропруссиду** натрия в различных отделах респираторного тракта. Там же с.208 (Соавт. Баскаков М. Б., Анфиногорова Я. Д., Капилевич Л. В.)

19. Особенности **эпителиязависимых** сократительных реакций гладких мышц в различных отделах респираторного тракта. Там же с. 209. (Соавт. Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А., Анфиногорова Я. Д.)
20. Особенности зависимых от эпителия сократительных реакций гладких мышц в различных отделах респираторного тракта // Бюлл. exper. биол. и мед.-1998.-Т. 126, N12.-С.618-620 (Соавт. Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А., Анфиногорова Я. Д.)
21. Исследование роли внутриклеточного пула Ca^{2+} в релаксирующем эффекте нитропруссид натрия в **гладкомышечных** клетках аорты крысы // Бюлл. exper. биол. и мед. - 1999, Т.127,N2.-С.177-179. (Соавт. Капилевич Л. В., Панов А. А., Попов А. Г., Баскаков М. Б., Медведев М. А.)
22. Исследование мембранных механизмов действия **нитросоединений**. Сб. резюме в ж. Пульмонология. 1999 г. "IX Нац. Конгресс по болезням органов дыхания. - Москва 31 октября - 3 ноября, XXI.7, с. 167 (Соавт. Попов А. Г., Бородин Ю. Л., Баскаков М. Б., Панов А. А., Капилевич Л. В., Медведев М. А.)
23. Роль монооксида азота в регуляции **эндотелиально-гладкомышечных** взаимодействий в стенке кровеносных сосудов малого круга кровообращения. Там же, с.167. (Соавт. Капилевич Л. В., Анфиногорова Я. Д., Коптева Л. Ю., Носарев А. В., Баскаков М. Б.)
24. Исследование **релаксирующего** действия нитропруссид натрия на гладкие мышцы, **предсокращенные фенилэфрином**. Сб. Межрег. науч. конф. Сиб. и Дал. Вост., посвящ. 150-летию со дня **рожд.** акад. Павлова И. П. 25-26 ноября, 1999г, Томск, ТГУ, - с. 187-189 (Соавт. Панов А. А., Попов А. Г., Бородин Ю. Л., Анфиногорова Я. Д., Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А.)
25. Исследование роли **цГМФ-зависимых** процессов в электромеханическом сопряжении гладких мышц. Там же, с. 189-191 (Соавт. Панов А. А., Попов А. Г., Бородин Ю. Л., Анфиногорова Я. Д., Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А.)
26. Релаксирующий эффект нитропруссид натрия в гладких мышцах: роль ионов кальция // Пульмонология. Сб. статей «Актуальные проблемы пульмонологии» - Москва - 2000 - с.722-729 (Соавт. Панов А. А., Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А., Попов А. Г., Анфиногорова Я. Д.)
27. Роль натрий-протонного обмена в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц // Рос. Физиол. ж. им. Сеченова - 2000,-Т.86,N1,- с.68-75 (Соавт. Баскаков М. Б., Капилевич Л. В., Медведев М. А.)
28. Влияние нитросоединений на электромеханическое сопряжение гладкомышечных клеток **мочеточника** // Бюлл. exper. биол. и мед.-2000.-Т.129,N5.-с.539-541 (Соавт. Панов А. А., Бородин Ю. Л., Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А., Анфиногорова Я. Д.)
29. Особенности холинэргической регуляции гладких мышц легочных **артерий кролика** // Бюлл. exper. биол. и мед.-2000.-Т.130,N8.-С.134-136 (Соавт. Капилевич Л. В., Анфиногорова Я. Д., Баскаков М. Б., Носарев А. В., Медведев М. А.)
30. Механизмы **НО-индуцированного** расслабления гладких мышц сосудов. Сб тез. межд. конф. Актуальные вопросы **кардиологии**, Томск, 14-15 сентября, 2000г., с.252 (Соавт. Попов А. Г., Панов А. А., Бородин Ю. Л., Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А., Анфиногорова Я. Д.)
31. Роль оксида азота (NO) во внутриклеточной регуляции гладкомышечных клеток // Вестник СГМУ, Томск.-2000.-N1- с.7-19. (Соавт. Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А.)

32. Механизмы действия **нитропруссид** натрия на гладкие мышцы, **предсокращенные фенилэфрином**. Сб. тез. межрег. конф. Актуальные вопросы медицины. Томск, 2000. С. 107-109.(Соавт. Баскаков М. Б., Панов А. А., Попов А. Г., Бородин Ю. Л., Капилевич Л. В., Медведев М. А., Анфиногорова Я. Д.)
33. Роль цГМФ - зависимых процессов в электромеханическом сопряжении ГМК. Там же, с.109-110 (Соавт. Баскаков М. Б., Панов А. А., Попов А. Г., Бородин Ю. Л., Капилевич Л. В., Медведев М. А., Анфиногорова Я. Д.)
34. Участие цГМФ в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц//Пробл.нейрогум.регул.физиол.ф-йвисс.с-м. В сб тез.докл. к конф. к 100-ю проф.Д.Я.Криничина –Омск:ИВМ,ОмГАУ,2000–с.36-38.(Соавт. Попов А. Г., Панов А. А., Анфиногорова Я. Д., Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А.)
35. Межклеточные взаимоотношения в **гладкомышечных** органах и сосудах. Сб. мат. 18 Съезда физиол. **об-ва им.И.П. Павлова-Казань-2001-с. 117.**(Соавт. Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Попов А. А., Бородин Ю. Л., Анфиногорова Я. Д., Медведев М. А.)
36. Внутриклеточные сигнальные системы в эпителий- и **эндотелийзависимых** процессах расслабления гладких мышц // Успехи физiol. наук.-2001.-Т.32, №2.-с.88-98. (Соавт. Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А.)
37. Особенности **гистаминэргической** регуляции гладких мышц легочных артерий кролика//Бюлл.экспер.биол.имед.-2001.-Т.132,№8.-С.142-144. (Соавт. Капилевич Л. В., Анфиногорова Я. Д., Носарев А. В., Баскаков М. Б., Дьякова Е. Ю., Медведев М. А.)
38. Исследование механизмов **НО-зависимого** расслабления гладких мышц аорты крысы с помощью **нитросоединений** // Экспер. и клин. фармакология.-2001.-Т.64, №3, с. 33-36.(Соавт. Попов А. Г., Панов А. А., Бородин Ю. Л., Анфиногорова Я. Д., Капилевич Л. В., Баскаков М. Б., Медведев М. А.)
39. Особенности регуляции гладких мышц сосудистой стенки легочной артерии кролика // Рос. Физ. ж. им. Сеченова-2002-Т.83, №4,-С.452-458 (Соавт. Капилевич Л. В., Носарев А. В., Дьякова Е. Ю., Баскаков М. Б., Анфиногорова Я. Д., Фролов В. Н., Медведев М. А.)
40. Реализация эффектов циклического **гуанозинмонофосфата** в гладкомышечных клетках.-В сб. тез. Докл. IV Съезда физиологов Сибири с межд. участием, **Нов-ск, 2002- С.117** (Соавт. Баскаков М. Б., Медведев М. А., Капилевич Л. В., Панов А. А., Попов А. Г., Бородин Ю. Л., Анфиногорова Я. Д., Миноченко И. Л., Килин А. А.)
41. Особенности регуляции гладких мышц сосудистой стенки легочной артерии **кролика.Там же, С.109** (Соавт. Капилевич Л. В., Носарев А. В., Дьякова Е. Ю., Баскаков М. Б., Анфиногорова Я. Д.)
42. Влияние ингибиторов **фосфолиэстераз циклических** нуклеотидов на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток // **Бюлл. exper. биол. и мед.-2002.-Т.133,№3.-С.254-256.** (Соавт. Попов А. Г., Баскаков М. Б. Миноченко И. Л., Килин А. А., Анфиногорова Я. Д., Капилевич Л. В., Медведев М. А.)
43. Особенности **адренэргической** регуляции гладких мышц легочных артерий кролика // Бюлл. exper. биол. и мед.-2002.-Т.133,№1.-С.47-50. (Соавт. Капилевич Л. В., Анфиногорова Я. Д., Носарев А. В., Баскаков М. Б., Дьякова Е. Ю., Медведев М. А.)
44. Inhibition of **Na⁺,K⁺,Cl⁻** prevents vascular smooth muscle contraction in **Na⁺- and Cl⁻-depleted media.**//**Journal of Hypertension-2002.-V.20,Suppl.4.-P.S280.** (The 19th scientific Meeting of the International Society of Hypertension, and 12th European Meeting on Hypertension, June 23-27, 2002. Prague, Czech Republic). (AnfinogenovaY., Kilin A., Baskhakov M., Orlov S.).

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СГМУ

Заказ №347

Тираж 100 экземпляров