

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

На правах рукописи

Бирулина Юлия Георгиевна

**РОЛЬ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ И ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В
РЕГУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЙ ГЛАДКИХ МЫШЦ СОСУДОВ
ПРИ ГИПОКСИИ И РЕОКСИГЕНАЦИИ**

03.03.01 – физиология

03.01.02 – биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук,
Гусакова С.В.,
доктор биологических наук,
профессор **Орлов С.Н.**

Томск – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Список принятых сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1	12
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
<i>1.1. Гипоксическое и реоксигенационное повреждение клеток</i>	12
<i>1.2. Влияние гипоксии и реоксигенации на сократительную активность гладких мышц сосудов</i>	19
<i>1.3. Роль газовых посредников в регуляции функциональных свойств гладкомышечных клеток</i>	27
<i>1.3.1. Монооксид углерода: метаболизм и механизмы действия</i>	27
<i>1.3.2. Сероводород: метаболизм и механизмы действия</i>	34
ГЛАВА 2	41
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
<i>2.1. Объект исследования</i>	41
<i>2.2. Методики исследования</i>	42
<i>2.2.1. Изучение сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты крысы</i>	42
<i>2.2.3. Исследование ионного гомеостаза и содержания АТФ в гладкомышечных клетках</i>	45
<i>2.3. Растворы и реактивы</i>	46
<i>2.4. Статистическая обработка</i>	47
ГЛАВА 3	48
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	48
<i>3.1. Исследование влияния гипоксии и реоксигенации на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы</i>	48
<i>3.1.1. Влияние гипоксии на сокращения сосудистых гладких мышц, индуцированные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином</i>	48

3.1.2. Влияние реоксигенации на сократительные реакции гладкомышечных клеток аорты крысы, вызванные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином	53
3.2. Исследование роли калиевой проводимости мембраны в механизмах действия гипоксии и реоксигенации на сократительную активность сосудистых гладких мышц	57
3.2.1. Влияние тетраэтиламмония на сокращения гладких мышц сосудов, вызванные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином, в условиях гипоксии и реоксигенации	57
3.2.2. Роль потенциал-зависимых калиевых каналов мембраны в реализации сокращений гладкомышечных клеток, вызванных гиперкалиевым раствором или фенилэфрином, в условиях гипоксии и реоксигенации	62
3.2.3. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов в механизмах сокращений сосудистых гладких мышц, индуцированных гиперкалиевым раствором или фенилэфрином, в условиях гипоксии и реоксигенации	66
3.2.4. Определение относительного вклада различных типов калиевых каналов в релаксирующее действие гипоксии и реоксигенации на сосудистые гладкие мышцы	70
3.3. Исследование влияния активности Na^+,K^+-АТФазы и гипоксии на внутриклеточное содержание моновалентных катионов	72
3.4. Изучение влияния газотрансмиттеров на сократительную функцию гладких мышц аорты крысы при действии гипоксии и реоксигенации	75
3.4.1. Влияние монооксида углерода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы в условиях гипоксии и реоксигенации	75
3.4.2. Влияние сероводорода на сократительную функцию гладкомышечных клеток аорты крысы в условиях гипоксии и реоксигенации	81
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
ВЫВОДЫ	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	91

Список принятых сокращений

- АТФ – аденозинтрифосфат
АФК – активные формы кислорода
ГМ – гладкая мышца
ГМК – гладкомышечная клетка
ДЦ – дыхательная цепь митохондрий
НАДН – никотинамидадениндинуклеотид
ПК А – протеинкиназа А
ПК С – протеинкиназа С
ПОЛ – перекисное окисление липидов
pГЦ – растворимая гуанилатциклаза
– сосудистая гладкомышечная клетка
СПР – саркоплазматический ретикулум
ТЭА – тетраэтиламмония хлорид
ФЭ – фенилэфрин
цАМФ – циклический-3,5-аденозинмонофосфат
цГМФ – циклический-3,5-гуанозинмонофосфат
[Ca²⁺]_i – внутриклеточная концентрация ионов кальция
[K⁺]_i – внутриклеточная концентрация ионов калия
[Na⁺]_i – внутриклеточная концентрация ионов натрия
3MST – 3-меркаптопироват-сульфуртрансфераза
BK_{Ca}-каналы – Ca²⁺-активируемые калиевые каналы высокой проводимости
Ca²⁺ – ионы кальция
CBS – цистотионин-β-синтаза
СО – монооксид углерода
CORM – carbon monoxide-releasing molecule – СО-освобождающая молекула
CSE – цистотионин-γ-лиаза
EDHF – эндотелий-зависимый гиперполяризующий фактор
H₂S – сероводород
HIF-1 – Hypoxia Inducible Factor-1 – гипоксия-индуцибельный фактор-1
НО – гемоксигеназа
K_v-каналы – потенциал-зависимые калиевые каналы
K_{АТФ}-каналы – АТФ-чувствительные калиевые каналы
МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа
NO – оксид азота
pO₂ – парциальное напряжение кислорода

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Изучение молекулярных механизмов регуляции сократительных свойств гладких мышц (ГМ) в физиологических и патологических условиях является актуальной проблемой современной науки. Однако некоторые вопросы до сих пор не нашли удовлетворительного решения, в том числе, касающиеся сопряжения возбуждения-сокращения в гладкомышечных клетках (ГМК) при нарушении их оксигенации.

Как известно, поддержание оптимального уровня парциального напряжения кислорода в клетках различных тканей и органов способствует протеканию метаболических и пластических процессов, обеспечивающих их функциональную стабильность. Гипоксия (кислородное голодание) же запускает во многом универсальные процессы [20, 28; 202], затрагивающие и ГМ сосудов, индуцируя вазодилатацию или констрикцию в зависимости от сосудистого региона [127, 179, 229, 233]. При этом изменяется ионная проницаемость мембран ГМК для различных катионов и анионов [53, 159, 182], оперирование ряда внутриклеточных сигнальных систем, среди которых преимущество отдается кальциевой [121, 143, 193], цАМФ- и цГМФ-зависимым сигнальным системам [139, 185], также наблюдаются транскриптомные изменения, направленные на адаптацию ГМК к условиям дефицита кислорода [222, 223]. Восстановление оксигенации тканей (реоксигенация), как свидетельствуют многочисленные исследования, несмотря на диаметрально противоположность гипоксическим процессам, запускает механизмы во многом с ними схожие, усугубляясь нарастающим диссонансом в работе внутриклеточных эффекторных систем ГМ [80, 190, 206].

Кроме этого, в регуляции сократительных реакций сосудистых ГМК при гипоксии и реоксигенации могут участвовать различные вазоактивные факторы, среди них и газовые посредники – монооксид углерода (СО) и сероводород (H₂S) [94, 106, 108, 167, 181]. Эндогенно продуцируемые, они

лиганд-независимым способом вовлекаются в механизмы регуляции большинства функций органов и тканей, в том числе и тонуса кровеносных сосудов [1, 11, 107, 158]. Известно, что уровень содержания CO и H₂S в клетках обусловлен протекающими в них физиологическими и патологическими процессами [108, 150]. Кроме того, осуществляя свои эффекты, газотрансмиттеры не могут не испытывать действия парциального напряжения кислорода. Причем, дополнительное включение внутриклеточных сигнальных и эффекторных систем, обусловленное особенностями их собственного влияния на сократительную активность ГМК, может изменяться при гипоксии и реоксигенации и быть еще одним указанием на молекулярные мишени, задействованные в изменении функциональной активности клеток.

Поиск и выявление внутриклеточных сигнальных механизмов, в том числе отдельных звеньев газовой коммуникации, ответственных за модуляцию сократительной функции гладких мышц, может стать основой для разработки подходов к управлению электрофизиологическими свойствами ГМК кровеносных сосудов при различных физиологических и патологических состояниях.

Степень разработанности темы

К настоящему времени накоплено достаточно данных, свидетельствующих о высокой чувствительности сосудистых ГМК к недостатку кислорода, что позволяет рассматривать их в качестве кислородного сенсора [77, 100, 172]. Однако механизмы реагирования ГМ на дефицит кислорода изучены недостаточно. В литературе мало представлены данные, касающиеся влияния реоксигенации на тонус кровеносных сосудов и оперирования внутриклеточных сигнальных систем, ассоциированных с ионами кальция, при нарушениях кислородного баланса. В последние годы активно исследуется влияние газотрансмиттеров на сократительную функцию сосудистых ГМ в норме и при гипоксии/реоксигенации [119, 140,

166, 196], но, по-прежнему, остаются нерешенными вопросы о механизмах подобного действия газовых посредников.

В связи с вышесказанным, **целью исследования** явилось изучение роли калиевых каналов и газовых посредников в механизмах регуляции сократительной активности сосудистых гладких мышц в условиях гипоксии и реоксигенации.

Задачи исследования

1. Исследовать влияние гипоксии и реоксигенации на сократительные ответы гладкомышечных клеток сосудов при гиперкалиевой деполяризации мембраны и активации α_1 -адренергических рецепторов.

2. Определить вклад кальциевой сигнальной системы в механизмы регуляции сократительных свойств гладких мышц аорты крысы при гипоксии и реоксигенации.

3. Изучить роль компонентов калиевой проводимости мембраны в действии гипоксии и реоксигенации на сократительную активность гладкомышечных клеток сосудов.

4. Исследовать влияние гипоксии и Na^+, K^+ -АТФазы на изменение внутриклеточного содержания АТФ, катионов натрия и калия в гладкомышечных клетках аорты крысы.

5. Оценить влияние монооксида углерода и сероводорода на сократительные ответы сосудистых гладких мышц при гипоксии и реоксигенации.

Научная новизна

Доказано релаксирующее действие гипоксии и реоксигенации на сократительную активность ГМК аорты крысы, вызванную деполяризацией мембраны гиперкалиевым раствором или активацией α_1 -адренергических рецепторов. Установлено, что расслабление ГМ более выражено на фоне их предсокращения α_1 -адреномиметиком фенилэфрином, чем хлоридом калия, при гипоксии и реоксигенации. Показано, что вазорелаксирующее действие

гипоксии и реоксигенации обусловлено открыванием потенциал-зависимых и/или Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов мембраны ГМК, а на фоне действия фенилэфрина – дополнительно активацией АТФ-чувствительной калиевой проводимости. Установлено, что при гипоксии, также как и при ингибировании Na^+, K^+ -АТФазы убаином, в изолированных ГМК аорты крысы происходит снижение внутриклеточного уровня макроэргов, концентрации ионов калия, но увеличение содержания ионов натрия. Получены новые данные о том, что в условиях гипоксии и реоксигенации происходит ослабление релаксирующего влияния монооксида углерода на сокращения сосудистых сегментов, индуцированные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином. Впервые установлено, что сероводород при гипоксии и реоксигенации вызывает расслабление ГМ, предсокращенных гиперкалиевым раствором и, напротив, разнонаправлено модулирует сокращения ГМК, вызванные фенилэфрином: угнетает их механическое напряжение при гипоксии и потенцирует при реоксигенации.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные являются вкладом в развитие фундаментальных представлений о механизмах сопряжения возбуждения-сокращения в ГМК при гипоксии и реоксигенации. Результаты исследования дополняют существующие знания о путях регуляции биологически активными веществами тонуса ГМ при нарушении их оксигенации. Приоритетные данные о роли газовых посредников (монооксида углерода и сероводорода) в механизмах регуляции сократительной активности ГМК при гипоксии и реоксигенации открывают перспективные подходы для разработки новых принципов коррекции патологических синдромов, связанных с нарушением двигательной функции ГМ кровеносных сосудов. Сформулированные в работе положения и основные методологические приемы используются в научных исследованиях кафедр биофизики и функциональной диагностики, нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского

университета. Области применения полученных данных являются физиология, патологическая физиология, биофизика.

Методология и методы исследования

Изучение сократительной активности ГМ выполняли механографическим методом на изолированных гладкомышечных сегментах аорты крыс-самцов линии Wistar. Данный метод позволяет напрямую исследовать механическую активность гладких мышц. С помощью радионуклидного метода оценивали изменение цитоплазматической концентрации моновалентных катионов натрия и калия в культуральных ГМК аорты крысы. Внутриклеточное содержание АТФ определяли с использованием люцифераза-зависимой индикации. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS Statistics 17.0.1 for Windows.

Положения, выносимые на защиту

1. Сократительные реакции гладкомышечных клеток аорты крысы, вызванные деполяризацией гиперкалиевым раствором или активацией рецептор-оперируемого входа ионов кальция, угнетаются в условиях гипоксии и реоксигенации.
2. Ослабление сократительных ответов сосудистых гладких мышц при гипоксии и реоксигенации опосредовано повышением калиевой проводимости мембраны гладкомышечных клеток.
3. Гипоксия, как и подавление Na^+, K^+ -АТФазы убаином, вызывают смещение ионного баланса моновалентных катионов в сторону увеличения внутриклеточного содержания ионов натрия на фоне снижения АТФ.
4. Монооксид углерода и сероводород при гипоксии оказывают релаксирующий эффект на предсокращенные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином сосудистые гладкомышечные клетки. В условиях реоксигенации данное действие газотрансмиттеры проявляют только на фоне действия гиперкалиевого раствора.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечена достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов исследования и соответствующих критериев статистической обработки полученных данных.

Основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались на Ежегодной Всероссийской научной школе-семинаре «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине – 2013» (г. Саратов, 2013 г.); 7th International congress of pathophysiology (Марокко, г. Рабат, 2014 г.); Международном Симпозиуме «Газомедиаторы: физиология и патофизиология» (г. Казань, 2014 г.); IV Съезде физиологов СНГ (г. Сочи, 2014 г.); научной конференции «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных функций в норме и патологии» (г. Томск, 2014 г.); X Международной (XIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (г. Москва, 2015 г.); Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Москва, Пущино, 2015 г.); 25th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection (Италия, г. Милан, 2015 г.); V Съезде биофизиков России (г. Ростов-на-Дону, 2015 г.), VI Всероссийской школе-конференции по физиологии кровообращения (г. Москва, 2016 г.).

Исследования поддержаны грантами ФЦП «Гипоксия как фактор регуляции транскриптома и сократительных свойств кровеносных сосудов» (соглашение 8487 от 23.10.2012 г.), РФФИ «Мой первый грант» (соглашение 16-34-00419 от 27.01.2016 г.)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 6 – в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 1 научная статья в зарубежном журнале и 7 – статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста, состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа содержит 5 таблиц, иллюстрирована 26 рисунками. Библиографический список включает 242 источников, из которых 192 – зарубежные.

Личное участие автора

Соискатель принимал непосредственное участие в сборе литературных данных по изучаемой проблеме, разработке дизайна и планировании исследования. Результаты были получены, обработаны и интерпретированы автором лично.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Гипоксическое и реоксигенационное повреждение клеток

Недостаточное поступление кислорода или же нарушение его утилизации в ходе биологического окисления может приводить к нарушению работы функционально-метаболических систем организма и снижению интенсивности пластических процессов.

Согласно современным представлениям кислородное голодание, в первую очередь, инициирует подавление синтеза макроэргов в реакциях, сопряженных с окислительным фосфорилированием на внутренней мембране митохондрий [26, 27, 38, 34]. Согласно Л.Д. Лукьяновой, в основе, так называемой, «биоэнергетической гипоксии» лежит последовательное изменение активности функционирования ферментов дыхательной цепи (ДЦ) митохондрий, зависящее от тяжести и/или продолжительности гипоксического воздействия [26, 27]. Так, первая (компенсаторная) стадия связана с инактивацией НАДН-зависимого пути окисления, что ведет к накоплению восстановленных пиридиннуклеотидов и торможению переноса электронов [155]. Этот процесс запускает компенсаторную активацию сукцинатоксидазного пути окисления, позволяющего сохранить энергосинтезирующую функцию цитохромного участка. При усугублении гипоксии наступает вторая (некомпенсируемая) стадия, которая характеризуется нарушением электрон-транспортной функции ДЦ в области цитохромов bc_1 , затем, уже при очень низких значениях pO_2 (1-2 мм рт. ст.), и терминальная стадия, обусловленная инактивацией митохондриального комплекса IV (цитохром *c* оксидазы). Высокая степень сродства цитохромоксидазы к кислороду позволяет ей функционировать вплоть до наступления аноксии.

Компенсаторная активация гликолиза в качестве поставщика АТФ в условиях гипоксии, как оказалось, малоэффективна и не способна

предотвратить падения энергообеспечения функционально-метаболических систем. Вслед за усилением реакций гликолиза наступает их торможение, обусловленное истощением запасов его субстратов и снижением активности ферментных систем [38, 49]. Кроме этого, повышенная интенсивность гликолитических процессов приводит к накоплению молочной кислоты. Избыточная концентрация лактата в цитоплазме вызывает снижение внутриклеточного рН и развитие метаболического ацидоза, который дополнительно усугубляется чрезмерным накоплением кислых продуктов метаболизма жирных кислот и аминокислот [82, 153]. Возникающий ацидоз ингибирует ферменты гликолиза, усиливает разобщение процессов окислительного фосфорилирования, способствует накоплению восстановленных переносчиков (НАДН, НАДФН), а также оказывает повреждающее действие на мембранные структуры клеток путем активации фосфолиполиза и процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), изменения конформационных свойств белков биомембран [2, 38, 49].

Очевидно, что снижение синтеза макроэргов в условиях гипоксии лежит в основе нарушения энергозависимых процессов, обеспечивающих поддержание функциональной активности различных внутриклеточных систем. Причем, наиболее ранние расстройства наблюдаются со стороны работы АТФ-зависимых ионных насосов [122, 126]. Одним из них является Na^+, K^+ -АТФаза, которая обеспечивает трансмембранный перенос ионов Na^+ и K^+ против градиента концентрации и поддержание, тем самым, значения потенциала покоя. Ее подавление в условиях дефицита АТФ приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$), снижению содержания ионов K^+ ($[\text{K}^+]_i$) и увеличению соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ [169, 222, 223]. Накопление Na^+ в цитоплазме клеток индуцирует возникновение вначале частичной, а затем и стойкой деполяризации клеток, нарушение их реполяризации и функциональной активности. Повышение $[\text{Na}^+]_i$ также приводит к инверсии работы $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ -обменника плазмалеммы и увеличению ионов Ca^{2+} в цитозоле [97, 54] Перераспределение ионов в

сочетании с повышенной проницаемостью плазматической мембраны при дезорганизации ее структуры и накоплением низкомолекулярных продуктов метаболизма способствует поступлению в клетку из внеклеточной среды молекул воды с последующим развитием внутриклеточной гипергидратации [175].

Большое значение в механизме гипоксических нарушений имеют также последствия, связанные с обменом Ca^{2+} , который выступает важным регулятором клеточного метаболизма. Отмечается, что центральным событием при этом является увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), которое может происходить как при избыточном поступлении ионов извне по потенциал-зависимым Ca^{2+} -каналам, так и высвобождении их из внутриклеточных депо – саркоплазматического ретикулула (СПР) и митохондрий [14, 47, 234]. В условиях гипоксии и энергодефицита имеет место снижение барьерной функции плазматической мембраны, сопровождающееся повышением ее проницаемости для Ca^{2+} , подавление активности энергоемкой $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазы плазмалеммы и мембраны СПР [41, 96, 154]. В результате этого нарушаются процессы удаления ионов Ca^{2+} из клеток с последующим накоплением их в цитоплазме. Кроме того, на фоне угнетения электрон-транспортной функции ДЦ происходит падение разности потенциалов на митохондриальной мембране ($\Delta\psi$), что приводит к потере митохондриями способности аккумулировать ионы Ca^{2+} [4, 40].

Установлено, что увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ приводит к активации Ca^{2+} -зависимых протеаз, мембранных фосфолипаз (фосфолипазы A_2 и, следовательно, арахидонового каскада, фосфолипазы С), протеинкиназ (Ca^{2+} -кальмодулин-зависимые, ПК С, MAPK – mitogen-activated protein kinase, JNK – c-Jun N-terminal kinase) [29, 185, 205], участвует в инициации процессов свободнорадикального окисления, транскриптомных изменений через Ca^{2+} -чувствительные транскрипционные элементы (Ca^{2+} -response elements – CRE) [173, 235]. Кроме того, имеются данные, подтверждающие участие Ca^{2+} в инактивации субстратного (НАДН-зависимого) участка ДЦ митохондрий,

что свидетельствует о его регуляторной роли в процессе ингибирования окислительного фосфорилирования при гипоксии [28].

Еще одним важным фактором, играющим немаловажную роль в повреждении клеток при гипоксии, является активация реакций свободнорадикального окисления. Источниками свободных радикалов могут быть самые различные процессы. Активные формы кислорода (АФК) могут синтезироваться как в случае неполного 4х-электронного восстановления кислорода (конечного акцептора), так и при прерывании цепи переноса с переходом электронов на растворенный в матриксе кислород [16, 20]. Известно, что даже в нормоксических условиях митохондриальные комплексы I и III способны генерировать супероксидный анион-радикал (O_2^-) и перекись водорода (H_2O_2) [10, 104, 232]. При гипоксии наблюдалось усиление образования АФК, что было сходно с условиями блокирования НАДН-зависимой дегидрогеназы ротеноном и убихинон-цитохром с редуктазы антимицином А [156]. Показано также, что синтезируемые АФК сильнее всего инактивировали транспорт электронов между НАДН-дегидрогеназой и убихиноном [26].

Продукция АФК, в частности супероксид-аниона, происходит и в ходе реакции, катализируемой мембранно-связанной НАДФН-оксидазой (NOX) [62, 215]. К настоящему времени в клетках млекопитающих идентифицировано 7 изоформ НАДФН-оксидаз, наиболее изученной из которых является NOX2 (gp91phox). Установлено, что подтипы DUOX1/2 способны генерировать также и пероксид водорода [215]. Показано, что неселективный ингибитор NOX – DPI (diphenyleneiodonium) способствовал снижению продукции АФК в клетках и связанному с этим повышению $[Ca^{2+}]_i$. [62]. Необходимо учитывать значение ксантиноксидазы, липооксигеназы, циклооксигеназы, NO-синтазы, митохондриальных монооксигеназ в генерации свободных радикалов при гипоксии [11, 32, 39]. Показано, что усиление продукции АФК при гипоксии ассоциировано со снижением активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы,

глутатионпероксидазы, каталазы), ацидозом, накоплением Ca^{2+} в цитоплазме, активацией процессов фосфолиполиза [49]. Цитотоксическое действие свободных радикалов связано с активацией процессов липопероксидации, которые приводят к нарушению упаковки липидов мембран, повышению их текучести и проницаемости [2, 49, 147].

Повышение пассивной проницаемости клеточной мембраны, подавление механизмов активного транспорта, возникающие еще в условиях гипоксии, обеспечивают беспрепятственное поступление в альтерированные клетки воды с растворенными в ней осмолитами в период реоксигенации [2, 80]. Избыточное поступление Na^+ , Cl^- приводит к формированию стойкой деполяризации мембраны, которая сменяется снижением возбудимости клеток и, соответственно, их дисфункцией. Накопление Ca^{2+} в цитоплазме ведет к активации большинства Ca^{2+} -зависимых ферментов (фосфолипаз, протеинкиназ, протеаз и др.), усилению ПОЛ (в сочетании с повышенным уровнем свободного Fe^{2+}), которые дополнительно обостряют процессы дезорганизации внутриклеточных процессов [147, 190]. Грубым нарушением барьерной функции мембран является выход ферментов, находившихся в цитозоле или субклеточных органеллах, во внеклеточное пространство [2]. Набухание митохондрий вследствие поступления в них ионов Ca^{2+} , K^+ , фосфатов и воды приводит к снижению утилизации поступающих субстратов в окислительно-восстановительных реакциях, разобщению дыхания и фосфорилирования, падению трансмембранной разности потенциалов, дефициту АТФ [103]. Временная активация анаэробного гликолиза при реоксигенации только усугубляет развивающийся метаболический ацидоз и способствует дальнейшей дестабилизации биомембран.

Доступность молекулярного кислорода, «утечка» электронов в цепи их переноса, накопление восстановленных переносчиков НАДН и НАДФН, активация процессов фосфолиполиза, сниженная активность антиоксидантных систем создают предпосылки для усиления образования АФК при реоксигенации и, как следствие, развития окислительного стресса.

В этих условиях на внутренней мембране митохондрий происходит открывание неселективной поры, известной как Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPTP). Пермеабиллизация мембран митохондрий способствует выходу в цитозоль апоптогенных факторов (основным из которых является цитохром *c*) и запуску митоптоза [198, 198, 206]. Данный процесс также находится под контролем проапоптотических белков семейства Bcl-2, $[Ca^{2+}]_i$, блокируется циклоспорином А и при связывании/инактивации АФК [103, 238].

Проблема устранения гипоксических и реоксигенационных повреждений, а также повышения устойчивости клеток и тканей к ним обсуждается давно. Известно, что в клетках в ответ на дефицит кислорода запускается целый комплекс защитных механизмов, направленных на поддержание и сохранение их функциональной активности. Уже на ранних этапах развития гипоксии отмечается активация срочных сигнальных каскадов, контролируемых ПК А и С, MAPK (p38, p42/44), NO-синтазами, фосфотидилинозитол-3-киназой (PI3K/Akt путь), конечным звеном которых являются эффекторные системы, играющие адаптивно-регуляторную роль [30, 63, 96, 235, 229].

В формировании приспособительных реакций особое место отводится специфическому белковому фактору, индуцируемому гипоксией – HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) [201, 202, 235]. Он представляет собой гетеродимерный белок, состоящий из двух субъединиц: индуцибельно экспрессируемой кислород-чувствительной HIF-1 α (120 кДа) и конститутивно экспрессируемой HIF-1 β (91-94 кДа). В условиях нормоксии в клетке содержание HIF-1 α поддерживается на низком уровне, т.к. основная его часть подвергается протеосомной деградации в реакциях пролилгидроксилирования и убиквитинации [97, 111]. Для функционирования пролилгидроксилаз (prolylhydroxylases, PHD1-3) необходим кислород, α -кетоглутарат, Fe^{2+} в качестве кофактора, аскорбат. Таким образом, при гипоксии (pO_2 менее 40 мм рт. ст.) создаются

предпосылки для инактивации пролилгидроксилаз, стабилизации и аккумуляции HIF-1 α , транслокации его в ядро, где HIF-1 α гетеродимеризуется с HIF-1 β с образованием транскрипционного комплекса (hypoxia-response elements – HRE), последующей экспрессией HIF-1-зависимых генов и синтезом адаптивных белков. Как показано, использование диметилноксалилглицина (DMOG) – ингибитора пролилгидроксилаз, также индуцировало HIF-1-опосредованную транскрипцию [61, 208]. Установлено, что экспрессия HIF-1 α находится под контролем MAPK, PK A, PI3K/Akt [111], а также AMPK (AMP-activated protein kinase) [204], поскольку ингибирование последней приводило к убиквитинации HIF-1 α и снижению его аккумуляции.

Кроме этого, обсуждается триггерная роль свободнорадикальных процессов в индукции адаптационных сигнальных каскадов. Предполагается, что продуцируемые при гипоксии свободные радикалы могут инактивировать пролилгидроксилазы, переводя ион Fe²⁺ в неактивную форму Fe³⁺, что препятствует деградации HIF-1 α и способствует его накоплению [97]. Большое значение при этом отводится АФК, генерируемым митохондриями. Так, Chandel N.S. с коллегами (2000) обнаружили, что ингибирование I комплекса ДЦ снижало активацию HIF-1 α при гипоксии. Они также высказали предположение о роли комплекса III в качестве источника АФК необходимого для стабилизации HIF-1 α [138, 186]. Тогда как, продуцируемые НАДФН-оксидазами и ксантиноксидазой АФК, наоборот, подавляли стабилизацию и аккумуляцию HIF-1 α [202]. Аналогично проявляли себя и антиоксиданты, связывая и инактивируя свободные радикалы. Установлено, что АФК могут активировать пути передачи сигналов через ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), JNK и p38MAPK (вовлеченные в регуляцию апоптоза), а также транскрипционные факторы NF- κ B и некоторые каспазы [42, 64, 139, 231].

Существует точка зрения, что аккумуляция HIF-1 α при гипоксии может быть связана с репрограммированием работы ДЦ митохондрий [27, 28]. Суть

его заключается в компенсаторной активации энергетически более выгодного сукцинатоксидазного пути окисления и повышенном образовании эндогенного сукцината, который является ингибитором пролилгидроксилазных реакций.

К настоящему времени идентифицировано порядка 180 генов, являющихся прямыми или опосредованными мишенями HIF-1. К ним относят гены, ответственные за регуляцию: тонуса сосудов (индуцибельная и эндотелиальная NO-синтазы, эндотелин-1, гемоксигеназа-1); ангиогенеза (VEGF и его рецептор Flt1) [89], эритропоэза и обмена железа (эритропоэтин, трансферрин) [229], энергетического метаболизма (глюкозные транспортеры, лактатдегидрогеназа, фосфофруктокиназа и др.), клеточной пролиферации и гибели (NIP3, NIX) [162, 208].

Изложенные выше процессы являются универсальными и протекают во многих клетках и тканях организма в ответ на действие гипоксии и реоксигенации, различаясь, вероятно, только по степени выраженности и скорости нарастания реакций.

1.2. Влияние гипоксии и реоксигенации на сократительную активность гладких мышц сосудов

Нарушение кислородного гомеостаза зачастую становится одной из причин изменения функции эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток (ГМК), формирующих стенку кровеносных сосудов [195]. ГМК играют важную роль в регуляции их тонуса, а, следовательно, системного артериального давления и локального снабжения тканей кислородом.

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что гипоксия приводит к расслаблению гладких мышц (ГМ) большинства сосудов и снижает силу их сокращений [90, 187, 200, 203]. В противоположность этому, имеются сведения, что легочная артерия и легочные вены в условиях дефицита кислорода, наоборот, подвергаются вазоконстрикции [127, 128, 179, 233]. К настоящему времени накоплено

достаточно данных, свидетельствующих о высокой чувствительности сосудистых ГМК (СГМК) к недостатку кислорода, что позволяет их рассматривать в качестве кислородного сенсора [77, 100, 172, 173]. Однако механизмы реагирования ГМ сосудистой стенки на дефицит кислорода изучены недостаточно.

Вопрос о том, является ли вазодилатация следствием прямого действия гипоксии на СГМК или она опосредована влиянием накапливающихся в этих условиях вазоактивных продуктов метаболизма, остается открытым. Также имеются свидетельства, что освобождаемые эндотелием вазорелаксирующие (оксид азота, простаглицлин, EDHF) [77, 165] и/или вазоконстрикторные (эндотелин-1 [137, 149], тромбоксан A_2 [194]) могут быть вовлечены в регуляцию сократительной активности ГМК в условиях дефицита кислорода.

Расслабление СГМК при гипоксии можно трактовать как следствие истощения в них ресурсов макроэргов, расходуемых в процессе взаимодействия сократительных белков и накопления недоокисленных продуктов обмена веществ [92]. Однако данные явления не могут быть признаны основными, и тем более единственными, определяющими величину тонического напряжения, развиваемого ГМК сосудистой стенки при снижении или повышении степени их оксигенации.

Поскольку ключевым событием в генерации сокращений гладкими мышцами является повышение $[Ca^{2+}]_i$ [7, 12, 33, 50, 221], то одним из первых встает вопрос об изменении кальциевого метаболизма в СГМК при дефиците кислорода.

Во многих исследованиях продемонстрирована связь между гипоксическим угнетением силы сокращений ГМК и содержанием кальция. Например, показано, что цианиды одновременно уменьшают поступление Ca^{2+} и фазные сокращения ГМ портальной вены [212]. Методом фиксации потенциала (whole-cell patch-clamp) в ГМК брыжеечной артерии кролика было зарегистрировано снижение Ca^{2+} -тока при гипоксии, а деполяризация мембраны ГМК аорты морской свинки гиперкалиевым раствором (20 мМ KCl)

или их агонист-опосредуемой стимуляции в условиях дефицита кислорода приводит к снижению поступления Ca^{2+} внутрь клеток [60, 99, 134]. Отмечается также, что гипоксическая вазодилатация коронарных ГМК, предсокращенных 20 мМ КСI, сопровождалась уменьшением $[\text{Ca}^{2+}]_i$, а реоксигенация в этих условиях приводила к незначительным колебаниям $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [90].

Как указывалось ранее, в условиях кислородного голодания происходит накопление ионов Ca^{2+} в цитозоле клеток, которое влечет за собой неблагоприятные последствия, поэтому наблюдаемое исследователями угнетение поступления Ca^{2+} можно рассматривать как некий защитный механизм ГМК, направленный на предотвращение перегрузки их кальцием.

Снижение потенциал-зависимого и/или рецептор-управляемого входа Ca^{2+} рассматривается как наиболее вероятный, но не основополагающий, процесс гипоксической вазодилатации. Первостепенная роль понижения потенциал-зависимого входа Ca^{2+} в период гипоксии была продемонстрирована в ГМК коронарных, мозговых, чревных и бедренных артерий [91, 121, 171, 187]. Показано, что в условиях низкого напряжения кислорода в ГМК аорты крысы наблюдалось блокирование Ca^{2+} -каналов L-типа сходное с действием антагонистов Ca^{2+} -каналов [98, 110, 203].

Необходимо также отметить, что в механизмах сопряжения возбуждения-сокращения ГМК задействованы не только ионы Ca^{2+} , поступающие извне, но и освобождаемые из СПР. Хотя в подавляющем большинстве сосудистых клеток СПР развит слабо (за исключением, может быть, ГМК почечной артерии), и количество поступающего из СПР Ca^{2+} зависит, как правило, от уровня его предзагрузки [13, 144, 161, 234]. В соответствии с последним, описываемое авторами увеличение внутриклеточного Ca^{2+} , связанное с угнетением работы Ca^{2+} -насоса СПР при гипоксии [96, 154, 183], было идентично ингибированию Ca^{2+} -АТФазы тапсигаргином [220].

Известно, что биохимические изменения, индуцируемые гипоксией (снижение АТФ, рН, изменения редокс-состояния), могут нарушать Ca^{2+} -освобождающую функцию СПР [151]. Так, в ГМК коронарной артерии крыс гипоксия приводила к снижению FPL-зависимого Ca^{2+} -индуцированного освобождения Ca^{2+} из СПР (calcium channel-induced Ca^{2+} release (CCICR) mechanism) [121], в тоже время, в некоторых исследованиях, отмечается, что гипоксия не влияла на кофеин-опосредованное освобождение Ca^{2+} из депо [121, 187]. В случае же с ГМК легочной артерии, имеются данные, что ее сокращение в условиях дефицита кислорода может быть связано с активацией рианодиновых рецепторов, входом Ca^{2+} по депо-оперируемым Ca^{2+} -каналам плазмалеммы (SOCC – store-operated Ca^{2+} -channels) [193]. Очевидно, что для уточнения роли СПР в гипоксических нарушениях сократительной функции СГМК необходимы дальнейшие исследования.

Вазодилатация в условиях дефицита кислорода также может быть индуцирована за счет снижения Ca^{2+} -чувствительности сократительного аппарата. В условиях нормоксии данный механизм, реализуемый через RhoA-зависимые серин/треониновые киназы (RhoA-associated kinase, ROCK), обеспечивает развитие поддерживаемой фазы сокращения ГМК даже при невысокой $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (так называемый, Ca^{2+} -независимый компонент сокращения) [11, 84, 191]. Подразумевается, что в условиях снижения напряжения кислорода ингибируется ROCK-зависимое фосфорилирование MYPT1 (регуляторной миозин-связывающей субъединицы) фосфатазы легких регуляторных цепей миозина. Данное явление описывается как Ca^{2+} -десенситизация при гипоксической вазорелаксации (Ca^{2+} -desensitizing hypoxic relaxation, CDHR) [67, 220]. Она была подтверждена в ГМ свиной коронарной артерии, когда гипоксия вызывала снижение силы сокращений за счет уменьшения фосфорилирования регуляторных цепей миозина при неизменном уровне $[\text{Ca}^{2+}]_i$. [66, 133]. Отмечается, что CDHR ослаблялась в присутствии ингибитора RhoA-киназы Y-27632. Предполагается также, что

сигнальные RhoA-зависимые киназы могут быть вовлечены и в формирование гипоксической легочной артериальной гипертензии [59, 133].

Снижение $[ATP]_i$ и pH несомненно играют определенную роль в подавлении входящих Ca^{2+} -токов [92, 153]. Так, в ГМК воротной вены Ca^{2+} -токи снижались соответственно с уменьшением АТФ, что вероятно, связано с дефосфорилированием белков Ca^{2+} -каналов при энергодефиците. Поскольку в клетках АТФ находится в форме Mg^{2+} -АТФ, то увеличение Mg^{2+} при гипоксическом снижении АТФ может оказывать блокирующее действие на Ca^{2+} -каналы, как было продемонстрировано в ГМК базилярной артерии [203]. Закисление цитоплазмы также приводило к уменьшению входа Ca^{2+} и его высвобождения из СПР, возможно, обусловленное блокированием Ca^{2+}, H^+ -обмена при гипоксии [47].

Обсуждая механизмы регуляции сократительной активности СГМК при нарушении их оксигенации, нужно учитывать и изменения калиевой проводимости [17, 83, 180, 210]. В ГМК идентифицированы различные типы калиевых каналов, различающиеся по структуре, плотности распределения и способу управления. Но во всех случаях повышение их проводимости вызывает увеличение выходящих токов калия и гиперполяризацию мембраны.

В качестве наиболее вероятной мишени действия гипоксии исследователями рассматриваются АТФ-чувствительные K^+ -каналы (K_{ATP} -каналы), присутствующие в мембране СГМК. В частности, они опосредуют механизм, лежащий в основе расслабления коронарных и церебральных сосудов при гипоксии [75, 77, 90, 99]. K_{ATP} -каналы, как известно, состоят из двух субъединиц: семейство K^+ -каналов входящего выпрямления (an inwardly rectifying K^+ -channel six family (Kir6.x)), которые образуют проводящую пору, и модуляторный рецептор сульфонилмочевины (sulphonylurea receptor (SUR)), который отвечает за фармакологические свойства канала [159]. При связывании внутриклеточного АТФ с субъединицей Kir6 происходит ингибирование данных каналов. Причем, показано, что ингибирование K_{ATP} -

каналов является не следствием их фосфорилирования, а прямого связывания с ними АТФ. При гипоксии снижение внутриклеточной концентрации АТФ, повышение уровня АДФ в сочетании с уменьшением рН ведет к открыванию данных каналов, гиперполяризации мембраны и снижению входящих Ca^{2+} -токов [56, 134, 159]. Результатом этого будет расслабление СГМК и увеличение кровотока в гипоксическом регионе. Существует достаточное количество экспериментальных доказательств того, что $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналы открываются при гипоксии. Вместе с тем имеются и некоторая неуверенность в универсальности такого механизма расслабления сосуда при гипоксии. Это связано отчасти с тем, что исследовалось в основном действие глибенкламида как блокатора этих калиевых каналов, который в ряде случаев оказался неспособным предотвратить функциональные нарушения при гипоксии. К тому же затруднительно идентифицировать и дифференцировать прямое влияние низкого напряжения кислорода на ионные каналы, учитывая их небольшую плотность (~300 $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналы/клетку в СГМК против ~50,000 каналов/клетку в кардиомиоцитах) [180].

Применив метод фиксации потенциала, Quayle J.M. с коллегами (2006) и Lynch F.M. с коллегами (2006) исследовали роль $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналов и изменений потенциал-зависимого Ca^{2+} -тока в гипоксической релаксации изолированной бедренной артерии крысы. Агонист-стимулированные сегменты артерии расслаблялись при гипоксии, и это расслабление не зависело от присутствия эндотелия и не изменялось в присутствии блокатора $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналов глибенкламида [56, 91]. Кроме того, есть данные, что $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -токи могут оставаться стабильными в условиях гипоксии, поскольку концентрация АТФ не снижается до уровня, необходимого для активации этих каналов [81, 132]. Однако гипоксическое снижение величины норадреналинового сокращения предотвращалось глибенкламидом и высокой наружной концентрацией ионов калия. Подобно этому в деэндотелизированных кольцах коронарной артерии свиньи гипоксическая релаксация была устойчива к глибенкламиду и высокому наружному уровню калия [81, 90, 187].

Локализующиеся в мембране СГМК Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы высокой (BK_{Ca}) проводимости также могут быть участниками процессов расслабления СГМК при гипоксии [145, 214, 240]. Открывание данных каналов может происходить спонтанно и являться следствием коротких локальных выбросов Ca^{2+} из СПР (Ca^{2+} sparks) [79] или следствием входящих токов Ca^{2+} . Возникающий при этом выходящий транзиторный калиевый ток может вести к гиперполяризации мембраны ГМК и расслаблению. Таким образом, значительное усиление Ca^{2+} -активируемого калиевого тока, обусловленное повышенным уровнем базального Ca^{2+} , позволяет объяснить снижение амплитуды сокращения СГМК в условиях гипоксии. Имеются данные о гипоксическом ингибировании K_{Ca} -каналов в церебральных сосудах [123], что, вероятно, обусловлено снижением чувствительности и/или связывания субъединиц K_{Ca} -каналов с Ca^{2+} . Согласно современным представлениям, BK_{Ca} -каналы являются высокоорганизованными олигомерными мембранными комплексами, активность которых модулируется большим количеством вторичных посредников. Предполагается, что именно они могут являться кандидатами на роль эффекторного звена в цепи молекулярных событий, ведущих к расслаблению СГМК [207].

Многими исследователями отмечается, что сокращения легочной артерии при гипоксии, вызваны угнетением проводимости потенциал-зависимых K^+ -каналов (K_v -каналов, типы $\text{K}_v1.2$, $\text{K}_v1.5$), что ведет к деполяризации мембраны, открыванию потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и поступлению Ca^{2+} в клетку [124, 143, 233]. Известно также, что K_v7 каналы [142] и $\text{K}_v2.1$ каналы [141] задействованы в гипоксической легочной артериальной гипертензии.

К вмешательству Cl^- -каналов в конечный результат необходимо подходить очень взвешенно, учитывая гетерогенность этих каналов и, как следствие, разнонаправленную реакцию на гипоксические изменения внутриклеточного метаболизма. Так, активно обсуждается роль Ca^{2+} -

активируемых Cl^- -каналов в вазореактивности легочной артерии в условиях недостатка кислорода [53, 65]. Учитывая важную роль $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспортера (NKCC) в поддержании неравновесного электрохимического потенциала ионов хлора, можно полагать, что объем-зависимый ионный транспорт может быть вовлечен в регуляцию сократительной активности ГМК при гипоксии [37]. Было показано, что в сосудистых сегментах и культуральных ГМК сосудов NKCC активируется при действии физиологически активных веществ, повышающих $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [76, 170]. Напротив, ингибирование этого переносчика наблюдается под влиянием вазодилататоров, стимулирующих цАМФ- и цГМФ-опосредованные сигнальные системы [231]. Следовательно, в условиях гипоксии оперирование данного ионного транспортера будет изменяться.

Флуктуации редокс-статуса, накапливающиеся АФК при гипоксии и, в основном, при реоксигенации также способны инициировать изменения тонуса сосудов путем влияния на различные редокс-чувствительные внутриклеточные мишени. Однако пока нет единого мнения, относительно происхождения этих АФК. Большинство исследователей склоняются к мнению, что они в основном генерируются НАДФН-оксидазами (изоформы NOX2, NOX1, NOX4) [100, 232] и, в меньшей степени, митохондриями [156, 157]. Известно, что гипоксическое сокращение ГМК легочной артерии обусловлено активацией АФК потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов [231, 232]; катионных TRP-каналов (transient receptor potential cation channels channels); высвобождением Ca^{2+} из СПР в цитозоль через рианодиновые и ИФ3-рецепторы [143, 204], ингибированием K_v -каналов [141]. На примере коронарной и почечной артерий продемонстрирована АФК-зависимая релаксация путем повышения уровня цГМФ, активации протеинкиназы G (ПК G) и ПК G-опосредованного фосфорилирования VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) [172], Ca^{2+} -десенситизации [66, 139], окисления цитозольного НАДФН [100].

Изменения ионной проводимости мембраны ГМК, активация внутриклеточных сигнальных каскадов в ответ на снижение уровня кислорода, в целом, приводят к увеличению экспрессии редокс-чувствительных и O₂-регулируемых факторов транскрипции. Следует отметить, что за исключением нескольких генов, экспрессия которых регулируется парциальным давлением кислорода, механизмы модуляции транскриптома СГМК при гипоксии остаются неизвестными. Согласно классическим представлениям, изменения транскрипции генов в условиях дефицита кислорода являются [Ca²⁺]_i-зависимыми [96, 235]. Однако было показано, что увеличение соотношения [Na⁺]_i/[K⁺]_i при гипоксии ГМ вследствие ингибирования Na⁺,K⁺-АТФазы также может индуцировать транскрипцию различных генов (Na⁺/_i/K⁺_i-чувствительные гены), и причем этот регуляторный механизм не опосредован повышением [Ca²⁺]_i [222, 223].

Понимание и детализация механизмов, обуславливающих реагирование ГМК сосудов на нарушения их оксигенации, является необходимым условием для разработки новых подходов и методов, в том числе фармакологических, для селективного управления их поведением.

1.3. Роль газовых посредников в регуляции функциональных свойств гладкомышечных клеток

В последние годы предприняты попытки выявления участия физиологически активных веществ, продуцируемых ГМК, в том числе вторичных посредников – газотрансмиттеров, в нарушениях сократительной функции ГМ сосудов при гипоксии и реоксигенации.

1.3.1. Монооксид углерода: метаболизм и механизмы действия

Одним из представителей семейства газовых посредников является монооксид углерода (СО). В настоящее время СО рассматривается как важный медиатор, регулирующий работу многих физиологических систем организма и процессы метаболизма в различных органах [45, 108, 146, 211].

Проведенные исследования показали, что субстратом для образования CO служит молекула гема, являющаяся небелковым компонентом гем-протеинов (гемоглобина, миоглобина, цитохромов, каталазы, пероксидазы и др.) [18, 152]. Процесс деградации гема происходит при участии определенных ферментных систем. Из их числа непосредственно в окислительном превращении гема участвуют: гемоксигеназа (НО) и биливердинредуктаза. НО катализирует реакции, приводящие к разрыву тетрапиррольного кольца гема с образованием CO (рисунок 1). НАДФН-зависимый фермент биливердинредуктаза восстанавливает биливердин до билирубина [22, 152, 107, 224].

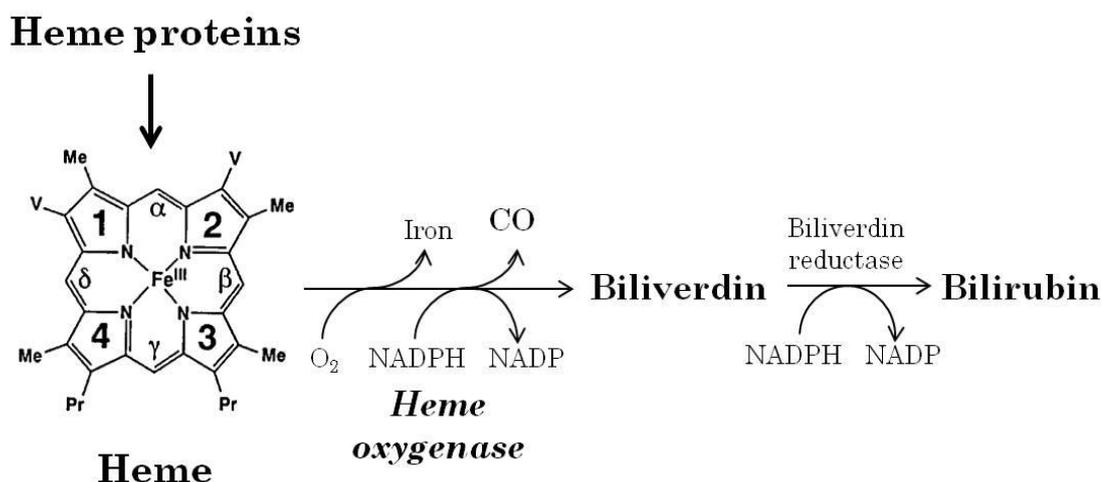


Рисунок 1. Синтез монооксида углерода гемоксигеназой [108].

В настоящее время известно три изоформы гемоксигеназ (НО-1, НО-2, НО-3). Индуцибельный изофермент НО-1 (32-34 кДа, также известен как белок теплового шока – HSP32) играет важную роль в механизмах адаптации клеток и тканей организма к различным патологическим процессам, в том числе, и к гипоксии. НО-1 изначально рассматривали как микросомальный белок, в основном локализованный в эндоплазматическом ретикулуме, но позднее она была обнаружена в цитоплазме, ядерном матриксе, пероксисомах и митохондриях селезенки и печени. Экспрессируется НО-1 и в эндотелиальных и ГМК сосудистой стенки, контролируя образование CO

[196, 211, 239]. Индукция данного фермента происходит при действии факторов различной природы – гема и гем-производных, перекиси водорода, окисленных липидов, цитокинов, эндотоксинов, тяжелых металлов и т.д. [52, 57]. Известно, что «свободный» гем в высоких концентрациях является прооксидантом, и прямым участником процессов свободнорадикального окисления, в связи с этим индукция HO-1, прежде всего, направлена на предотвращение цитотоксического воздействия продуктов распада гем-протеинов [52, 136]. Накопление АФК, приводящее к развитию окислительного стресса, в свою очередь, индуцирует транскрипцию генов HO-1. Показано, что ингибирование HO-1 под действием металлопорфиринов – хром-мезопорфирин (CrMP), цинк-протопорфирин (ZnPP), олово-протопорфирин (SnPP) – приводило к усилению АФК-зависимых повреждений клеток органов при ишемии/реперфузии [106, 108]. Нокаутирование мышей по HO-1 при гипоксии вызывало воспаление легких, гипертрофию стенок легочных сосудов и гипертензию. Тогда как повышение экспрессии HO-1 в этих условиях сопровождалось снижением выработки провоспалительных цитокинов и уменьшением вазоспазма [168]. Выявленные защитные механизмы, вероятно, обусловлены продуктами HO-1-реакции, обладающими антиоксидантными свойствами (ферритином, связывающим Fe^{2+} , билирубином), а также релаксирующим действием CO. Во многих клетках, индукция HO-1 наблюдается при стимуляции продукции NO донорами оксида азота и его производных, образовании S-нитрозотиолов и S-нитрозоглутатиона [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**74]. Наряду с редокс-зависимой регуляцией уровня экспрессии HO-1, отмечается участие в этом процессе ПК A и G, MAPK [239].

Конститутивная изоформа HO-2 (36 кДа), имеющаяся во многих тканях, определяет скорость деградации гема в физиологических условиях. Максимально она представлена в сердечно-сосудистой и нервной системах [52, 106]. Показано, что HO-2 активируется комплексом Ca^{2+} -кальмодулин, так ингибитор кальмодулина – кальмидозолиум снижал каталитическую

активность HO-2 и продукцию CO [106]. А наличие в ее структуре O₂-чувствительного участка позволяет рассматривать ее, наряду с HO-1, как гем/кислородный сенсор, активирующийся при гипоксическом воздействии. Изофермент HO-3 также является конститутивным гомологом HO-2, представлен повсеместно, но обладает низкой каталитической активностью [136].

Кроме гемоксигеназной системы, способствующей образованию CO, описаны альтернативные его источники в организме. Таковыми могут являться ПОЛ, фотоокисление органических соединений, процессы биотрансформации ксенобиотиков (фенобарбитал, дифенин) [136, 168].

Эндогенная продукция CO лимитируется доступностью субстрата, поэтому механизмы, которые регулируют продукцию гема в клетке, тем самым регулируют и продукцию CO. Отмечается, что в физиологических условиях продукция CO не превышает 20 мкМ/ч, а ее увеличение может иметь место при различных патологических состояниях, в том числе сопровождающихся гипоксией [196, 224].

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что CO и его доноры (CORMs) участвуют в регуляции миогенного тонуса сосудов, вызывая расслабление ГМК [1, 74, 105, 146, 239]. Вазорелаксирующее действие CO, как показано, связано с его способностью регулировать ионную проницаемость мембран клеток через модуляцию различных типов ионных каналов [160, 178, 236].

Активация монооксидом углерода ВК_{Ca}-каналов рассматривается многими исследователями как основополагающий механизм действия данного газомедиатора [160, 239]. ВК_{Ca}-каналы состоят из двух нековалентно связанных между собой субъединиц: порообразующей α -субъединицы и β -субъединицы, модулирующей открывание каналов. Открывание ворот канала происходит при аллостерическом связывании Ca²⁺ с Ca²⁺-сенсором («Ca²⁺-сенсоры RCK1» и «Ca²⁺-сенсоры RCK2») в цитоплазматическом домене канала и/или путем активации его трансмембранного потенциал-

чувствительного домена при деполяризации мембраны [69]. Открывание VK_{Ca} -каналов приводит к гиперполяризации мембраны, снижению входящего Ca^{2+} -тока и релаксации ГМК [71]. CO увеличивает вероятность открытого состояния ворот канала, не требуя активации его потенциал-чувствительного домена, даже в среде с пониженным содержанием Ca^{2+} [85].

Действуя на VK_{Ca} -каналы, CO может напрямую связываться с белками этих каналов либо же вступать во взаимодействие с молекулами-регуляторами каналов, среди которых важная роль принадлежит гемму [105], выполняющему роль ингибитора VK_{Ca} . Свободный гем регулирует активность VK_{Ca} путем высокоаффинного связывания с консервативной аминокислотной последовательностью, расположенной между двумя доменами α -субъединицы, формируя рецептор для CO. Внутри гем-связывающий домен образован остатками гистидина (His365 и His394) [69], которые являются специфической мишенью действия CO в VK_{Ca} -каналах. Показано, что действие диэтилпирокарбоната (DEPC) – соединением, вступающим в химические взаимодействия только с непротонированным имидазольным кольцом, устраняло стимулирующее действие CO на эти каналы, также как и фотоокисление остатков гистидина [239]. Имеются сведения, что His365 и His394 в большей степени чувствительны к низким концентрациям CO, в связи с этим возникает вопрос, взаимодействует ли CO напрямую с His365 и His394, или же существует дополнительный сенсор, вступающий во взаимодействие с CO и передающий информацию к воротам канала [69]. Показано, что в ответные реакции VK_{Ca} -каналов на действие CO вовлечены и остатки цистеина (Cys), так, Cys911 расположен рядом с сенсором Ca^{2+} RCK2 [72]. При мутации Cys911 наблюдалось преимущественное снижение эффективности действия CO на VK_{Ca} -каналы без изменения полумаксимальной действующей концентрации донора CORM-2 [239]. Помимо прямого воздействия на данные каналы, CO может регулировать его активность опосредованно через взаимодействие с другими молекулами, участвующими в регуляции этих каналов, в частности, с ПК G,

которая фосфорилирует остатки серина (Ser855, Ser869 и Ser1072) цитоплазматического домена канала, увеличивая вероятность открывания ворот канала. СО способен стимулировать растворимую гуанилатциклазу (pГЦ), следовательно, активацию ПК G [69, 72].

Наряду с VK_{Ca} -каналами предполагается, что релаксирующее влияние СО на СГМК может быть реализовано через активацию K_v -каналов [73, 178] или $K_{ATФ}$ -каналов плазмалеммы [236]. Так в экспериментах с глибенкламидом (10 мкМ), селективным блокатором $K^+_{ATФ}$ -каналов, наблюдалось угнетение расслабляющего действия СО на ГМК сосудов. Однако взаимодействие СО и $K^+_{ATФ}$ -каналов остается недостаточно изученным.

Помимо K^+ -каналов в роли мишеней действия СО могут выступать и потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы L-типа. Предполагается, что СО связываясь с митохондриальным комплексом IV, увеличивает продукцию митохондриями АФК [189, 224], которые в свою очередь модифицируют цистеиновые остатки белков каналов [236]. В противоположность этому, имеются сведения, что СО активировал Ca^{2+} -каналы L-типа ГМК кишечника через NO-зависимые сигнальные механизмы [176].

Другим способом влияния на ионную проводимость мембраны СГМК считается активация pГЦ [69]. Связывание СО с железом гема pГЦ сопровождается изменением конформации фермента, лежащей в основе его активации [209]. Что, в свою очередь, ведет к увеличению образования цГМФ, являющегося одним из важных посредников внутриклеточной передачи информации. Ингибирование pГЦ – ODQ вызывало ослабление сократительных эффектов СО в различных ГМК [15, 57]. Большинство эффектов цГМФ опосредовано через цГМФ-зависимую ПК G, которая фосфорилирует регуляторные белки-мишени в клетках и тем самым модулирует их функциональную активность. Интересно, что *in vitro* NO в 30–100 раз более сильный стимулятор pГЦ, чем СО [74] и NO-индуцированная вазорелаксация в 1000 раз больше, чем СО-модулируемая.

Наряду с имеющимися данными о СО как вазодилататоре, показано, что в условиях окислительного стресса он может проявлять констрикторное действие [88, 146]. В свою очередь, СО-индуцированная продукция АФК [189] является необходимым для индукции антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион) и регуляторных генов. СО, как установлено, повышал экспрессию HIF-1 α мышечных клетках [196], направленную на сохранения клеточного гомеостаза при гипоксии/реоксигенации [140]. Интересно, что СО также может ингибировать NOX, хотя аффинность СО к NOX низка, и эта реакция протекает медленно [69].

Воздействуя на различные сигнальные каскады, включая PI3K/Акт [107], активацию NF- κ B, p38 MAPK [189, 196], JNK-1 and -2 [239], цГМФ/ГЦ [177], СО способен оказывать антиапоптотическое, противовоспалительное, антипролиферативное, действие, рассматриваемое многими исследователями как протекторный эффект газомедиатора [70, 94, 140, 158]. Peyton K.J. с коллегами (2002) установили, что СО предотвращал пролиферацию СГМК и блокировали экспрессию циклина А, активацию циклин А-зависимых киназ. Ограничение роста ГМК путем повышения освобождения СО может представлять собой важное событие в компенсаторной ответной реакции организма на гипоксию, т.к. избыточно развитая стенка сосудов препятствует нормальному осуществлению процессов метаболизма в тканях [109].

Эти и многие другие данные свидетельствуют о том, что НО/СО-опосредованный внутриклеточный сигнальный путь является неотъемлемой частью общей системы коммуникации различных клеток, том числе и ГМК. А это, в свою очередь, открывает перспективы для разработки новых перспективных технологий управления функцией клеток путем модуляции СО-зависимых эффекторных систем.

1.3.2. Сероводород: метаболизм и механизмы действия

Еще одним представителем семейства газотрансмиттеров является сероводород (H_2S). Продукция и роль H_2S были продемонстрированы в клетках различных тканей организма [93, 117, 118, 216, 230], в том числе и сердечно-сосудистой системе [43, 112, 218].

Известны ферментативный и неферментативный пути синтеза H_2S . Ферментативный синтез возможен благодаря работе двух цитозольных пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов: цистотионин- β -синтаза (CBS) и цистотионин- γ -лиаза (CSE), а также 3-меркаптопируват-сульфуртрансферазы (3MST) – фермента, зависимого от Zn^{2+} и локализованного в цитоплазме и в митохондриях [48, 87, 101, 213]. Показано, что в СГМК синтез H_2S осуществляет фермент CSE [87]. Его экспрессия была обнаружена в аорте, мезентериальной, хвостовой и легочной артериях крыс [241], во внутренней грудной артерии человека [83].

Хотя для эндотелиальных клеток сосудистого русла экспрессия CSE показана не была, в них отмечена возможность образования H_2S ферментом 3MST, который функционирует в комплексе с CAT – цистеин-аминотрансферазой. Выделяют митохондриальную и цитозольную формы CAT. Последняя, используя в качестве субстрата серосодержащую аминокислоту L-цистеин и α -кетоглутарат, продуцирует 3-меркаптопируват, из которого при участии фермента 3MST синтезируется H_2S . В отсутствие α -кетоглутарата синтез H_2S прекращается. В ГМК кровеносных сосудов 3MST локализована совместно с гладкомышечной α -изоформой актина ASM-1, которая является маркером СГМК. В то же время экспрессия CAT показана только для эндотелиальных клеток [225].

CSE и CBS также используют в качестве субстрата L-цистеин, катализируя реакцию его десульфгидратации: отщепление от цистеина атома серы без последующего его окисления ведет к образованию H_2S (рисунок 2). Под действием CSE происходит преобразование цистина до тиоцистеина,

пирувата и аммиака с последующим преобразованием тиоцистеина до цистина и H_2S . Тогда как, CBS использует несколько иной путь синтеза H_2S , заключающийся в конденсации гомоцистеина с цистином, и последующим образованием цистатионина [3, 150, 242]. Также в качестве субстратов могут использоваться и другие серосодержащие аминокислоты, такие как метионин и цистин [227].

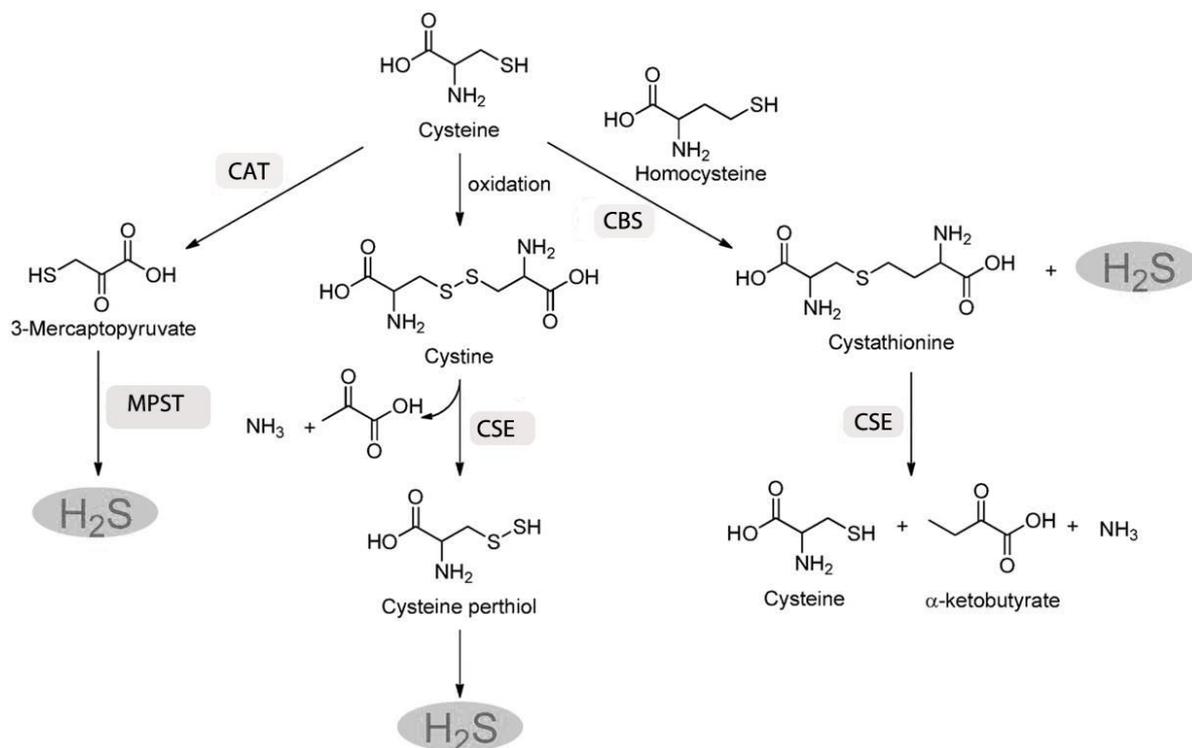


Рисунок 2. Схема синтеза сероводорода [242].

Обозначения: CBS – цистатионин- β -синтаза, CSE – цистатионин- γ -лиаза, MPST – 3-меркаптопируват-сульфуртрансфераза, CAT – цистеин-аминотрансфераза.

Неферментативный путь синтеза H_2S заключается в восстановлении серы до H_2S при окислении глюкозы. Эритроциты, используя эквиваленты, полученные при окислении глюкозы, восстанавливают S до H_2S^- . В то же время, если реакция идет по фосфоглюконатному пути, синтез H_2S может не зависеть от уровня серы. Так, активация фосфоглюконатного пути в условиях окислительного стресса приводила к усилению синтеза НАДФ,

используемого в различных антиоксидантных реакциях, результатом которых является образование H_2S [199]. Также возможностью неферментативного синтеза H_2S является его получение из глутатиона [230].

Катаболизм H_2S изучен в меньшей степени. Известно, что H_2S быстро окисляется, главным образом, в митохондриях до тиосульфата, который затем преобразуется в сульфит и сульфат. Основной путь окисления H_2S до тиосульфата происходит неферментативно и связан с электрон-транспортной цепью в митохондриях [150]. Фермент тиосульфат-цианид-сульфуртрансфераза (TST) переносит серу от тиосульфата к различным акцепторам (например, цианидам), осуществляя тем самым превращение тиосульфата в сульфит. Образованный сульфит окисляется до сульфата сульфитоксидазой. Таким образом, конечным продуктом метаболизма H_2S является сульфат, который считается специфическим маркером продукции H_2S в организме. Утилизация H_2S также может происходить в цитозоле, и заключается в метилировании H_2S тиол-S-метилтрансферазой (TSMТ) до метантиола и диметилсульфида [83]. Кроме того, H_2S может присоединяться к метгемоглобину, образуя сульфгемоглобин [230, 242].

Согласно многочисленным данным, H_2S является важным регулятором тонуса кровеносных сосудов [21, 78, 130, 226, 227]. Он вызывает расслабление СГМК, причем степень H_2S -индуцированного расслабления превосходит таковую при действии NO [93, 181, 227]. Выраженное вазодилатирующее действие H_2S позволяет рассматривать его в качестве возможного антигипертензивного средства.

Наиболее широко обсуждаемой мишенью действия H_2S в клетке считают $K_{ATФ}$ -каналы плазматической мембраны [46, 93, 241]. Показано, что варьирование $[ATФ]_i$ не влияло на величину H_2S -индуцированной активации этих каналов, что подтверждает гипотезу прямой активации $K_{ATФ}$ -каналов. Показано, что H_2S сульфгидрирует субъединицу Kir6.1 данных каналов [102, 113]. Известно также, что в физиологических условиях активация $K_{ATФ}$ -каналов усиливается при связывании субъединицы Kir с

фосфотидилинозитол-4,5-бифосфатом (PIP₂), что сопровождается снижением его связывания с АТФ. Активация K_{АТФ}-каналов приводит к расслаблению СГМК [159].

Известно также, что в механизмы, обуславливающие H₂S-индуцированное расслабление ГМК, могут быть вовлечены BK_{Ca}- и IK_{Ca}-каналы [112], K_v⁺-каналы. Ингибирование последних вызывало снижение расслабляющего действия донора сероводорода NaHS [8, 51].

Имеются данные, указывающие на участие H₂S в кальциевом обмене через взаимодействие его с транспортерами ионов Ca²⁺, в частности, Ca²⁺-каналами L-типа и Na⁺,Ca²⁺-обменником. Показано, что NaHS дозозависимым образом снижал величину Ca²⁺-токов через каналы L-типа. Тогда как, дитиотреитол (ДТТ), являющийся восстановителем, действовал на цистеин-содержащие белки, преобразуя дисульфидные связи в сульфгидрильные группы, и устранял индуцированное NaHS ингибирование Ca²⁺-токов [102]. На эндотелиальных клетках крысы показано, что H₂S индуцирует работу Na⁺,Ca²⁺-обменника в обратном направлении, обуславливая вход Ca²⁺ в клетку. Использование соответствующего ингибитора KB-R7943, в свою очередь, устраняло стимулирующее влияние NaHS на перенос Ca²⁺ в клетку этим транспортером [230].

Еще один эффект H₂S на ГМК, отмечаемый лишь некоторыми авторами, наблюдается при действии его низких концентраций (в диапазоне 10 – 100 мкМ) и заключается в дополнительном увеличении сократительных ответов [120, 226]. Предполагается, что данное констрикторное действие H₂S обусловлено угнетением аденилатциклазы и, соответственно, цАМФ-зависимой сигнальной системы. Во всяком случае, показано, что H₂S ослаблял и даже обращал релаксирующее действие активатора аденилатциклазы – форсколина в сократительное [8, 226].

С другой стороны, показано, что H₂S в малых концентрациях оказывает констрикторное действие на сокращения СГМК в гиперкалиевом растворе Кребса за счет повышения активности НКСС. Так, констрикторное действие

NaHS (5-100 мкМ) наблюдалось в деэндотелизированных кольцевых сегментах аорты крыс, предсокращенных гиперкалиевым раствором, и устранялось буметанидом – ингибитором NKCC. Дополнительные исследования на изолированных ГМК аорты крысы показали усиление активности NKCC при действии NaHS (5-100 мкМ) [8], однако молекулярные механизмы активации NKCC при действии NaHS не установлены. По-видимому, активируя этот котранспортер, H₂S вызывает усиление выходящего хлорного тока, обуславливающего деполяризацию мембраны, открывание дополнительного числа потенциал-зависимых Ca²⁺-каналов и увеличение [Ca²⁺]_i в ГМК, способствующее развитию поддерживаемого сокращения [76, 164]. Предобработка ГМК ингибиторами Na⁺,H⁺-обмена и NKCC изменяла направленность сократительных реакций (для NO), либо практически их исключала (для H₂S). Использование безнатриевых растворов приводило, хотя и менее выражено, к тому же результату [8].

Имеются сведения, что констрикторное действие H₂S является эндотелий-зависимым и обусловлено взаимодействием H₂S и NO. Инкубация с донорами NO увеличивала продукцию H₂S в сосудистых тканях крысы [241]. При легочной гипертензии наблюдалось увеличение продукции H₂S и активация CSE в присутствии L-аргинина [129]. Таким образом, очевидно, что гомеостаз H₂S и NO играет важную роль в поддержании сосудистого тонуса.

Согласно последним данным H₂S является не только сигнальной молекулой, регулирующей работу мембранных и внутриклеточных структур, но и внутриклеточным сенсором кислорода. В связи с этим, эндогенно синтезируемый H₂S может выступать в качестве антигипоксического фактора, тогда как экзогенный H₂S может использоваться в профилактике и терапии индуцированных гипоксией нарушений функциональной активности клеток, в том числе и СГМК [163, 166]. В настоящее время нет однозначных данных о том, какие мембранные и внутриклеточные механизмы сероводород как сигнальная молекула задействует в условиях гипоксии.

Показано, что гипоксия стимулирует эндогенный синтез H_2S ферментом CSE [68, 228], который, в свою очередь, способен связываться с АФК, снижая их внутриклеточную концентрацию и нивелируя повреждающее действие окислительного стресса на клетки [114, 166]. В исследованиях с флуоресцентными индикаторами АФК было показано, что предобработка эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVVEC), находящихся в условиях гипоксии, NaHS (60 мкМ) снижала интенсивность флуоресценции по сравнению с группой клеток, не обработанных NaHS, что свидетельствует о способности H_2S «поглощать» внутриклеточные АФК [242]. Одним из эффектов H_2S является угнетение им активности NOX и образования супероксиданиона, ингибирующего активность K_{ATP} -каналов [95].

Известно, что H_2S в условиях гипоксии способен модулировать активность регуляторных белков апоптоза, предотвращая повреждение структуры и функции митохондрий [114, 116, 184], ингибирует индуцируемые АФК киназы ERK1/2 и p38MAPK [130, 148]. Было показано, что H_2S снижает содержание HIF-1 и его активность в культуральных клетках ГМК в условиях гипоксии [230], увеличивает уровень регуляторного белка апоптоза Bcl-2, снижает экспрессию Bax и ингибирует каспазу-3 и каспазу-9.

Существует точка зрения, согласно которой H_2S является сенсором кислорода и окисление внутриклеточного H_2S кислородом напрямую зависит от концентрации последнего в клетке [166, 167]. На основании многочисленных экспериментальных наблюдений на различных чувствительных к кислороду тканях было получено, что: 1) экзогенный H_2S вызывает такие же физиологические эффекты, как и гипоксия; 2) внутриклеточная продукция H_2S находится в обратной зависимости от pO_2 при физиологическом диапазоне значений pO_2 ; 3) агонисты и антагонисты синтеза H_2S усиливают и ослабляют ответные реакции на гипоксию, соответственно; 4) H_2S и гипоксия действуют через схожие эффекторные

пути [115, 167]. Тем не менее, транлокация CSE и образование H_2S может быть звеном в механизме работы кислородного сенсора и развития вазодилатации при гипоксии [115].

Имеются сведения, что в условиях хронической гипоксии снижается содержание H_2S в плазме крови, на основании чего была выдвинута гипотеза о том, что снижение его содержания способствует повышению тонуса легочных артерий при гипоксии [131]. С другой стороны, установлено, что ингибиторы синтеза H_2S полностью устраняли как констрикторный, так и дилатационный ответ со стороны легочных артерий, вызванный гипоксией, а субстрат эндогенного синтеза H_2S – L-цистеин, напротив, усиливал выраженность ответа на гипоксию [166].

Исследования на коронарных артериях собак показали, что при гипоксии под действием H_2S из эндотелия высвобождается эндотелиальный констрикторный фактор (EDCF), который, возможно, участвует в эндотелий-зависимой вазоконстрикции. В то же время селективный антагонист рецепторов к эндотелину-1 – бозентан – существенно не влиял на гипоксическое сокращение коронарных артерий свиньи [77, 83].

Учитывая вышесказанное, представляется необходимым более детальное изучение мембранных и молекулярных механизмов регуляторного действия газомедиаторов в ГМК при физиологических и патологических условиях с целью выявления наиболее оптимальных способов управления функциональным состоянием клеток при помощи газовых посредников и их сигнальных систем. Несомненно, также, что изучение механизмов взаимодействия CO- и H_2S -зависимых сигнальных путей, определение точек соприкосновения позволит улучшить понимание тонких механизмов регуляции сократительной активности ГМК.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Исследования проводили на изолированных препаратах гладких мышц аорты крысы. Для экспериментов использовали 11-13-недельных крыс – самцов линии Wistar (190 особей), которых умерщвляли цервикальной дислокацией после интраперитонеального введения пентобарбитала натрия (Nembutal, в дозе 70 мг/кг). Все манипуляции выполнялись в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г.) и ФЗ РФ «Об ответственном обращении с животными» (от 23.03.2011 г.)

Выделенный грудной отдел аорты крысы помещали в физиологически сбалансированный солевой раствор Кребса, отпрепаровывали жировую и соединительную ткань при комнатной температуре (20-25°C), после чего приготавливали сосудистые сегменты шириной 2-3 мм. Деэндотелизацию изолированных гладкомышечных сегментов выполняли непосредственно перед выполнением эксперимента путем механического вращения деревянного шпателя в их просвете. Подготовленные гладкомышечные препараты использовали немедленно, оставшуюся часть сосудистого материала сохраняли в холодильнике при 4°C.

Определение внутриклеточного содержания моновалентных катионов и АТФ выполняли в культуре ГМК аорты крысы, используемой не более 10 пассажей (Lonza, Walkersville, MD, США). Культивирование клеток производили в модифицированной среде Дульбекко (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, США), содержащей 10% бычьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, в специализированном инкубаторе. Для синхронизации культуры ГМК перед экспериментами клетки инкубировали в течение 24 часов в присутствии 0,2% телячьей сыворотки.

2.2. Методики исследования

2.2.1. Изучение сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты крысы

Сократительную активность гладкомышечных сегментов исследовали методом механографии. Изменения механического напряжения (МН) сосудистых сегментов в условиях, близких к изометрическим, регистрировали при помощи четырехканальной системы Myobath II и аппаратно-программного комплекса LAB-TRAX-4/16 (Германия) для проведения специализированных электрофизиологических исследований.

Полученные сосудистые гладкомышечные сегменты помещали в рабочие аэрируемые камеры экспериментальной установки объемом 10 мл, растягивали нагрузкой 500 мг и фиксировали с помощью стальных крючков. После чего камеры заполняли физиологическим солевым раствором Кребса и термостатировали при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (рисунок 3).

Перед началом исследования сегменты аорты крысы отмывали физиологическим раствором в течение 40-50 мин (рН 7,35-7,4), после чего дважды вызывали сокращение гиперкалиевым раствором Кребса (эквимолярно замещали 30 мМ NaCl на KCl). В ряде экспериментов сократительные реакции СГМК вызывали добавлением в нормальный раствор Кребса α_1 -адреномиметика фенилэфрина (ФЭ, 1 мкМ).

Моделирование условий гипоксии для изучения ее влияния на сократительные ответы СГМК производили путем вытеснения кислорода из омывающего сегменты раствора. Для чего исследуемый раствор непосредственно перед воздействием насыщали газообразным азотом (N_2 , чистота 99,95%). Содержание кислорода в растворе не превышало $10,0 \pm 0,2$ об.% и контролировалось портативным оксиметром HI 9146-04 (HANNA, Германия). Процесс сатурации раствора индифферентным газом осуществляли в изолированной от атмосферного воздуха, обогреваемой термостатом стеклянной колбе, после чего его подавали в рабочие камеры.

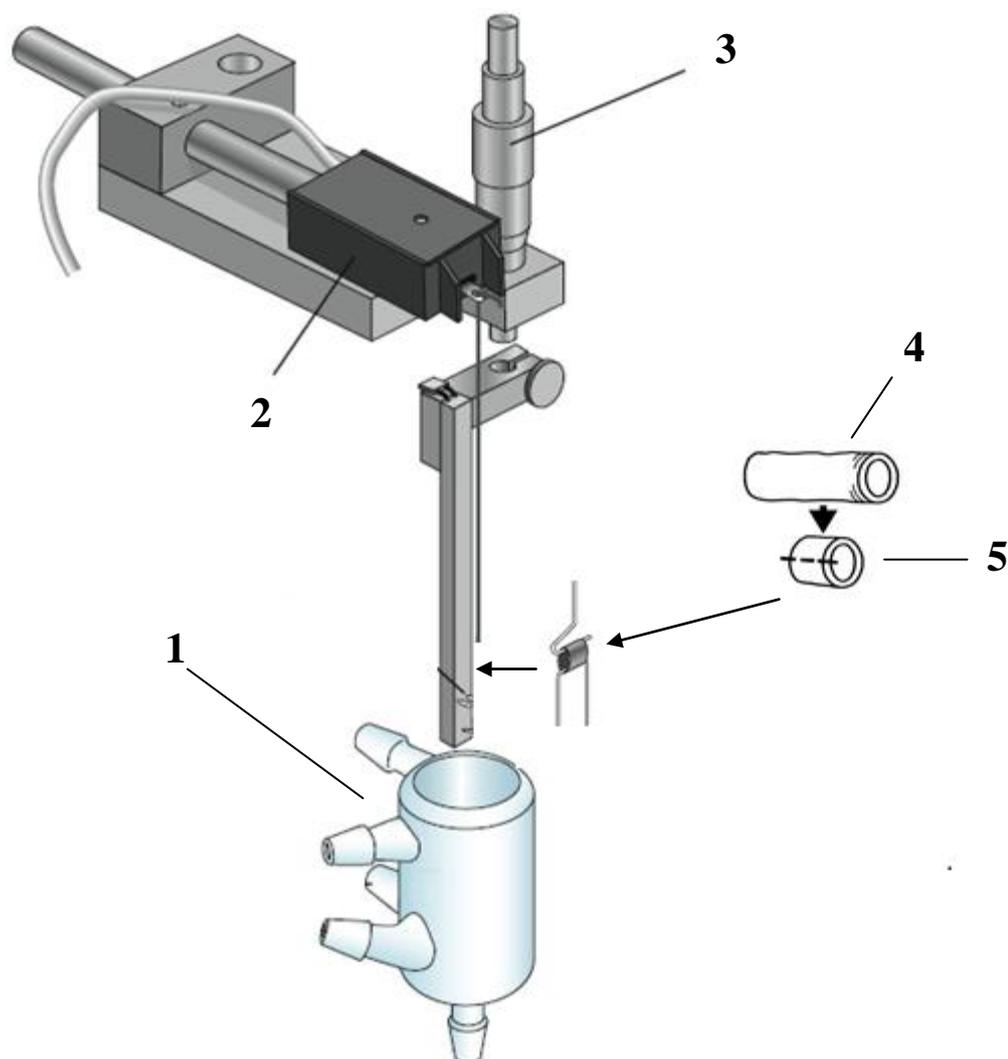


Рисунок 3. Схема канала для измерения механического напряжения гладкомышечных сегментов:

- 1 – камера для гладкомышечного препарата;
- 2 – датчик силы;
- 3 – микрометр;
- 4 – кровеносный сосуд;
- 5 – гладкомышечный сегмент

После инкубации гладкомышечных сегментов в гипоксигенированном растворе Кребса в течение 60 мин оценивали их сократительную активность на действие тестирующих соединений. Реоксигенация достигалась сменой гипоксигенированного раствора на физиологический с нормальным содержанием кислорода. Спустя 15 мин после смены раствора регистрировали изменение МН сосудистых гладких мышц.

Амплитуду сократительных ответов на действие гиперкалиевого раствора Кребса или фенилэфрина считали контрольной и принимали за 100%. Последующее изменение механического напряжения гладкомышечных сегментов рассчитывали в процентах от амплитуды контрольного сокращения. В условиях гипоксии и реоксигенации индуцируемые гиперкалиевым раствором Кребса или ФЭ сократительные реакции СГМК обозначали как фоновые и принимали за отсчетные для оценки эффектов исследуемых соединений.

Относительный вклад (n) различных компонентов калиевой проводимости мембраны в механизмы действия гипоксии и реоксигенации на сокращения ГМК определяли по формуле [25] как отношение величины МН гладкомышечных сегментов в присутствии блокатора i -тых каналов к сумме показателей МН сосудистых ГМ в присутствии каждого из блокаторов калиевых каналов, согласно формуле:

$$\frac{M_n}{M_0} = \frac{1}{1 + \sum_{i=1}^n \frac{M_i}{M_0}}, \quad (1)$$

где M_n – амплитуда сокращения сосудистых сегментов (%) в присутствии блокатора исследуемых каналов ($i=1,2,3,\dots,j$); M_0 – величины МН (%) сегментов аорты на фоне действия каждого из блокаторов.

Соответственно, чем выше значение n , тем больше степень участия изучаемых каналов в механизмах действия гипоксии и реоксигенации.

2.2.3. Исследование ионного гомеостаза и содержания АТФ в гладкомышечных клетках

Исследуемую культуру ГМК аорты крысы перед началом экспериментов отмывали в бескальциевой среде DMEM (Sp-DMEM, Invitrogen) и затем инкубировали 6 часов при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в контрольной среде DMEM, бескальциевой среде DMEM (Sp-DMEM, Invitrogen) и DMEM с добавлением 3 мМ убаина. Контрольная среда DMEM содержала (мМ): 140,1 NaCl; 5,4 KCl; 1,8 CaCl₂; 0,8 MgSO₄; 29,8 NaHCO₃; 0,9 NaH₂PO₄; 8,4 HEPES; 5 глюкоза, витамины и аминокислоты в соответствии с рецептурой ($[Na^+]_o/[K^+]_o=140,1/5,4$ мМ).

Для исследования влияния гипоксии на внутриклеточный ионный состав ГМК аорты крысы, клетки инкубировали в специально разработанных герметичных кюветах в среде, содержащей 0,5 мМ глюкозы, с заменой в инкубаторе атмосферы 5%CO₂/воздух на 5%CO₂/N₂. Предварительно было показано, что 8-часовое инкубирование ГМК в атмосфере 5%CO₂/N₂ способствовало снижению pO₂ ~ 30 мм рт. ст., в сравнении с нормоксией pO₂ ~ 150 мм рт. ст.

Внутриклеточное содержание катионов K⁺, Na⁺ измеряли как стационарное распределение изотопов ⁸⁶Rb, ²²Na между клетками и средой инкубации, соответственно. Для этого клетки высевали в 12-луночные планшеты и инкубировали 3 часа в контрольной или бескальциевой среде (Sp-DMEM+Ca²⁺) в присутствии 0,5 мкКи/мл ⁸⁶Rb, 4 мкКи/мл ²²Na с добавлением затем 3 мМ убаина. ГМК, нагруженные ²²Na, переносили на среду Sp-DMEM+Ca²⁺ с добавлением ²²NaCl, тогда как клетки с ⁸⁶Rb – на Sp-DMEM+Ca²⁺ свободную от изотопа. Накопление изотопов останавливали 4-часовым промыванием клеток с 2 мл ледяной среды, содержащей 100 мМ MgCl₂ и 10 мМ HEPES-tris-буфера (pH 7,4).

После чего оценивали радиоактивность инкубационной среды и клеточного лизата (1% SDS и 4 мМ ЭДТА) с помощью жидкостного

сцинтилляционного анализатора. Содержание катионов (V (нмоль/мг за 10 мин)) рассчитывали по формуле:

$$\text{---}, (2)$$

где A – радиоактивность образцов (распад/мин), a – радиоактивность изотопов в среде (распад/мин/нмоль) и m – содержание белка в лизатах (мг).

Внутриклеточное содержание АТФ измеряли путем анализа люцифераза-зависимой люминесценции в соответствии с набором инструкций (Sigma, St. Louis, MO, США).

2.3. Растворы и реактивы

Используемые в экспериментах растворы готовились на основе дистиллированной воды с добавлением соответствующих реактивов (ХЧ, «Реахим», РФ).

Физиологический раствор Кребса содержал (мМ): 120,4 NaCl, 5,9 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, 5,5 глюкозы, 15 NH₂C(CH₂OH)₃ [tris(hydroxymethyl)-aminomethane] (рН 7.4). Гиперкалиевый раствор (30 мМ) готовили на основе нормального раствора Кребса, эквимолярно замещая 30 мМ NaCl на KCl.

В растворах поддерживались значения рН в пределах 7,35-7,4 и температуры 37±0,5°C.

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

1. 4-аминопиридин (Sigma, США);
2. гидросульфид натрия (NaHS) (Sigma, США);
3. глибенкламид (Sigma, США);
4. тетраэтиламмония хлорид (Serva, Германия);
5. уабаин (Sigma, США);
6. фенилэфрин (Sigma, США);
7. ²²NaCl, ⁸⁶RbCl (PerkinElmer, Waltman, MA, США);
8. tricarbonyldichlororuthenium(II)-dimer (CORM-2) (Sigma, США).

Глибенкламид и CORM-2 растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO). DMSO в максимальной концентрации 0,1% не влиял на измеряемые показатели.

2.4. Статистическая обработка

Статистический анализ данных проводили при помощи программы SPSS Statistics 17.0.1 for Windows методами статистического описания и проверки статистических гипотез. Для оценки значимости количественных показателей в группах сравнения предварительно определяли соответствие полученных данных нормальному закону распределения с помощью W-критерия Шапиро-Вилка. Сформированные выборки не подчинялись закону нормального распределения, поэтому данные описывали с использованием медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_1-Q_3). Для оценки достоверности различий количественных показателей применяли непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни (U test Mann-Whitney) для независимых и T-критерий Вилкоксона (Wilcoxon Signed Ranks Test) для зависимых выборок [9, 23]. Межгрупповые различия данных в независимых выборках оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса (Kruskal-Wallis) с учетом поправки на множественное сравнение. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование влияния гипоксии и реоксигенации на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы

Изменение сократительной функции сосудистых гладкомышечных клеток рассматривается в качестве основного способа их реагирования на нарушения кислородного гомеостаза [77, 100]. Наблюдаемые при этом миогенные эффекты являются следствием взаимодействия различных мембранных и молекулярных регуляторных механизмов, обеспечивающих функциональную активность гладких мышц в целом [19, 24, 36].

3.1.1. Влияние гипоксии на сокращения сосудистых гладких мышц, индуцированные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином

Ключевым этапом развития процессов сопряжения возбуждения-сокращения в ГМК является увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , которые могут поступать из внеклеточной среды через Ca^{2+} -каналы, а также освобождаться из внутриклеточных немитохондриальных депо [14, 17, 31].

Для активации входящего потенциал-зависимого кальциевого тока гладкомышечные сегменты аорты крысы подвергали воздействию 30 мМ раствора хлорида калия (30 мМ KCl), в результате чего наблюдалось сокращение ГМК. После достижения стабильного значения амплитуды гиперкалиевой контрактуры, сегменты отмывали в нормальном растворе Кребса.

Затем сосудистые сегменты инкубировали в гипоксическом растворе Кребса различные промежутки времени, после чего вызывали их гиперкалиевое сокращение.

Снижение уровня кислорода в омывающем растворе не влияло на исходное механическое напряжение (МН) сосудистых ГМ, однако вызывало угнетение сократительной активности, индуцированной гиперкалиевым раствором Кребса.

Согласно полученным данным, статистически значимое снижение величины МН гладкомышечных препаратов, предсокращенных 30 мМ хлорида калия, наблюдалось только спустя 60 мин пребывания в растворе с низким содержанием кислорода. 90- и 120-минутная предобработка сегментов в гипоксигенированном растворе Кребса также приводили к последующему угнетению гиперкалиевой контрактуры ГМК аорты крысы, но незначимо различались с часовой инкубацией (таблица 1).

Для дальнейших исследований механизмов возникновения и развития релаксирующего эффекта гипоксии на сократительную функцию гладкомышечных сегментов сосудов был выбран интервал предобработки длительностью 60 мин (рисунок 4).

Таблица 1 – Влияние гипоксии на механическое напряжение гладкомышечных сегментов аорты крысы, Me (Q₁-Q₃)

Амплитуда сокращений, индуцированных 30 мМ КСl (%)				
Контроль (n=10)	Время инкубации в условиях гипоксии			
	30 мин (n=10)	60 мин (n=10)	90 мин (n=10)	120 мин (n=10)
100	96,87 (89,67-99,33) p ₁ <0,05	87,18 (85,74-89,63) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	85,08 (81,46-90,02) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	79,81 (74,97-92,3) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05

Примечание: p₁ – статистически значимые различия по сравнению с контролем; p₂ – с 30-минутной инкубацией в гипоксическом растворе.

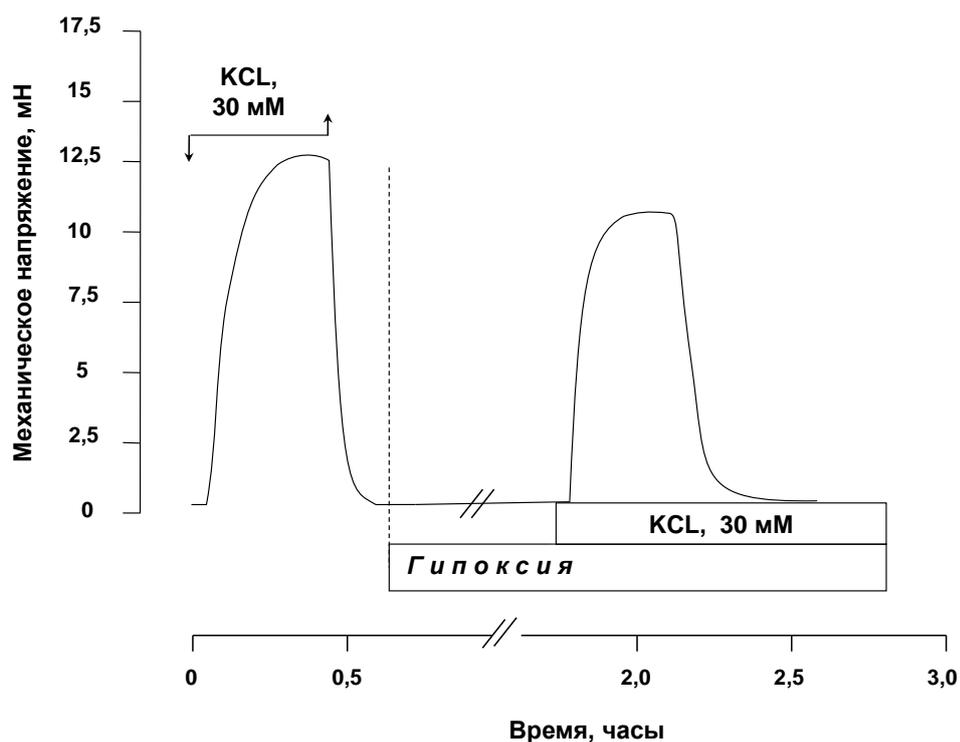


Рисунок 4. Влияние гипоксии на механическое напряжение гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором.

Обозначения: по оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (часы). Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

Сократительные ответы сосудистых ГМ инициируются многими биологически активными соединениями. Для изучения механизмов действия гипоксии на регуляцию сократительной активности ГМК аорты крысы, вызванную стимуляцией α_1 -адренергических рецепторов, применяли фенилэфрин (ФЭ).

Амплитуда сокращений сосудистых гладкомышечных сегментов в ответ на добавление ФЭ в концентрации 1 мкМ в сбалансированный солевой раствор Кребса была сравнима с ответной реакцией на действие гиперкалиевого (30 мМ KCl) раствора.

Снижение содержания кислорода в перфузионном растворе достоверно угнетало последующую сократительную реакцию сосудистых препаратов, индуцированную ФЭ (рисунок 5).

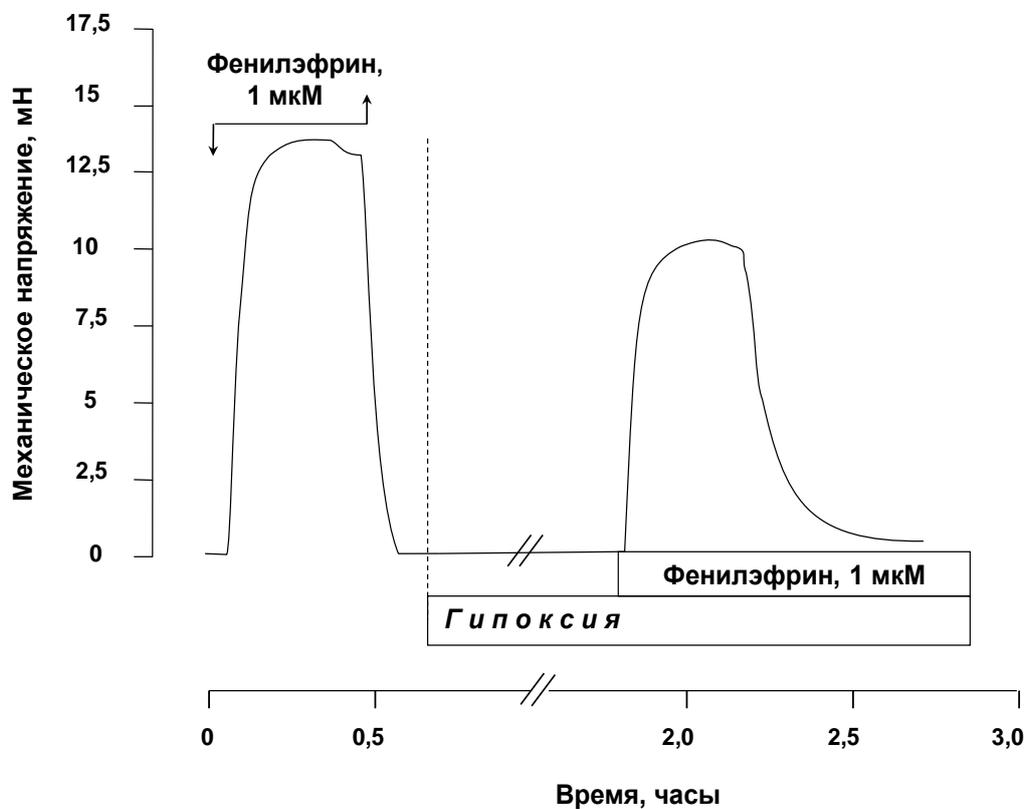


Рисунок 5. Влияние гипоксии на фенилэфрин-индуцированное сокращение гладкомышечного сегмента аорты крысы.

Обозначения: как на рисунке 4.

Величина механического напряжения СГМК составила 78,61 (76,64-80,48)% ($n=9$, $p<0,05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения в условиях нормоксии. Сокращение, вызванное ФЭ в условиях гипоксии, оказалось достоверно ниже по амплитуде в сравнении с индуцированным 30 мМ хлоридом калия в гипоксическом растворе (рисунок 6).

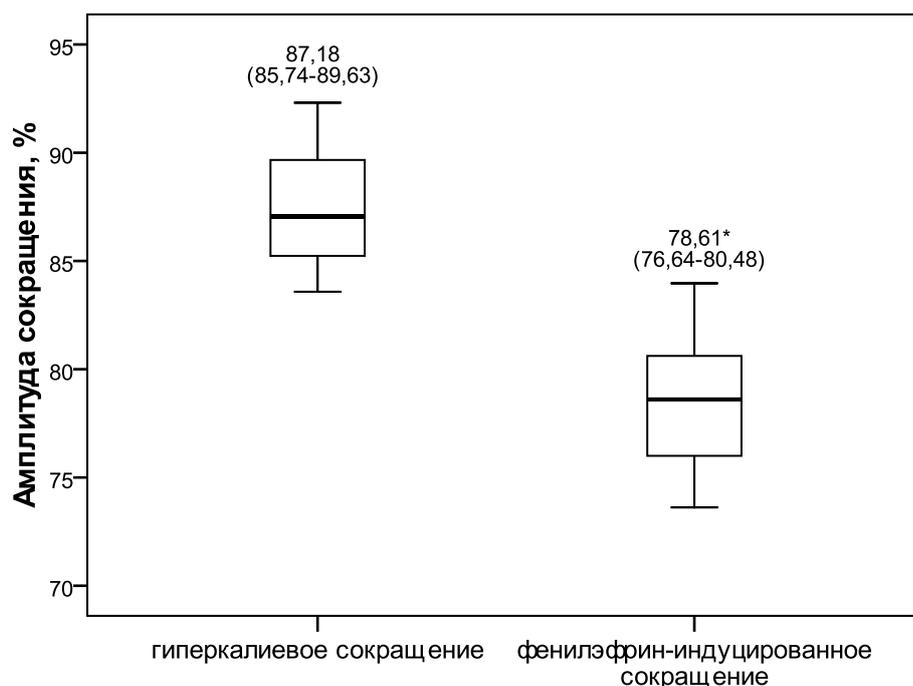


Рисунок 6. Изменение величины механического напряжения гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором или фенилэфрином, в условиях гипоксии.

Обозначения: * – статистически значимые различия с гиперкалиевым сокращением ($p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что гипоксия оказывает более выраженное релаксирующее действие на сокращения ГМК, вызванные фенилэфрином, чем 30 мМ хлоридом калия. Такая реакция, вероятно, обусловлена различием в природе индуцируемых контрактур, и в случае фенилэфрина – активацией рецептор-управляемого входа ионов кальция и дополнительным вовлечением внутриклеточного сигнального каскада, опосредованного метаболизмом мембранных фосфоинозитидов и протеинкиназы С (ПК С) [187].

Calderon-Sanchez E. и соавт. (2009) показали, что в условиях гипоксии вследствие дефицита синтеза макроэргов уменьшается пул фосфотидилинозитол-4,5-бифосфата, являющегося предшественником

вторичных мессенджеров – диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трифосфата, вовлеченных в механизмы внутриклеточной сигнальной трансдукции [121].

Вклад ПК С в механизмы регуляции гипоксической вазодилатации неоднозначен. С одной стороны, существуют данные относительно ее активации при гипоксии с последующим фосфорилированием эффекторных мишеней [205], с другой – ее угнетение и деградация [63].

Имеются также свидетельства, что вазодилатация в условиях дефицита кислорода может быть индуцирована за счет Ca^{2+} -десенситизации сократительного аппарата ГМК, в большей степени развивающейся при действии агониста α_1 -адренергических рецепторов. Реализуется данный механизм, вероятно, через ингибирование RhoA-киназы (RhoA-associated kinase, ROCK) [66, 67]. Мишенью для ROCK является фосфатаза легких цепей миозина, угнетение которой существенно модулирует степень их фосфорилирования и, таким образом, сокращение гладкомышечных сегментов [59, 84].

3.1.2. Влияние реоксигенации на сократительные реакции гладкомышечных клеток аорты крысы, вызванные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином

Для исследования влияния реоксигенации гладкомышечные сегменты аорты крысы после 60-минутной инкубации в гипоксическом растворе Кребса помещали в раствор с нормальным содержанием кислорода. Подобная смена омывающего раствора не изменяла исходного механического напряжения сосудистых препаратов. Спустя 15 мин регистрировали сократительные ответы СГМК на действие тестирующих соединений.

В условиях реоксигенации амплитуда сокращений гладких мышц аорты крысы, вызванных гиперкалиевым раствором, статистически значимо снижалась, составив 80,48 (76,91-86,32)% (n=9, p<0,05) от контрольного значения в условиях нормоксии (рисунок 7).

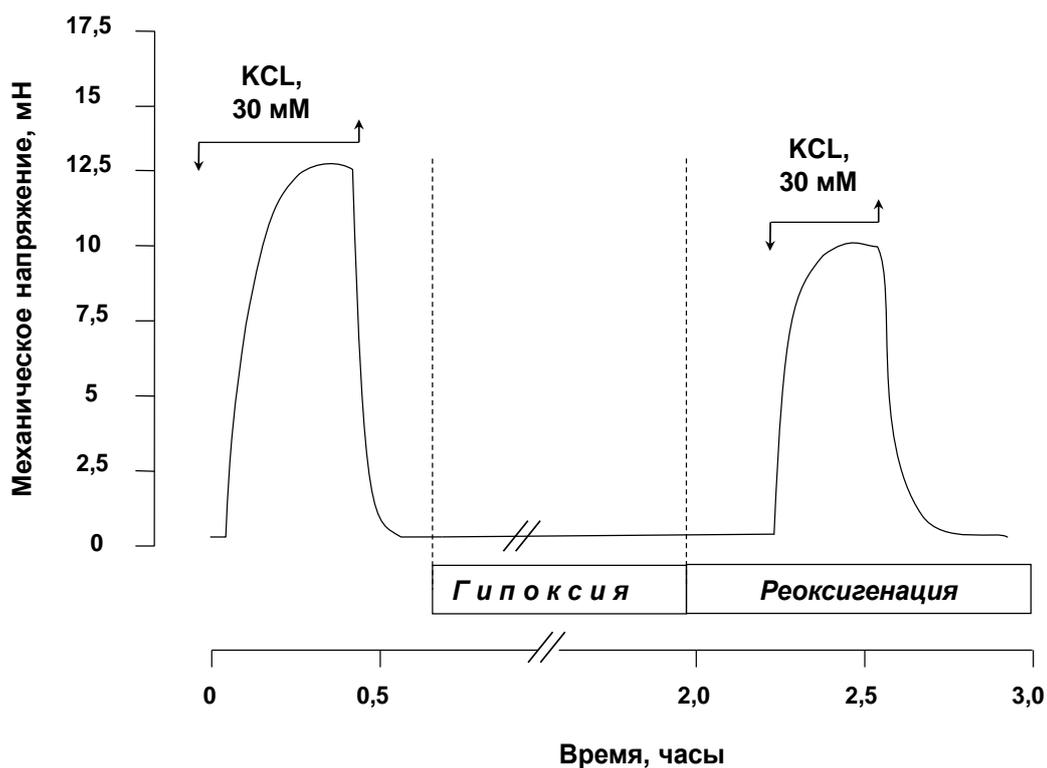


Рисунок 7. Влияние реоксигенации на механическое напряжение гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым (30 мМ KCl) раствором.

Обозначения: как на рисунке 4.

При этом величина механического напряжения, развиваемого гладкомышечными сегментами аорты крысы в ответ на действие 30 мМ хлорида калия в условиях реоксигенации, была достоверно ниже, чем аналогичная при гипоксии.

Добавление α_1 -адреномиметика ФЭ в концентрации 1 мкМ в процессе реоксигенации индуцировало сокращения гладкомышечных препаратов аорты, но амплитуда их составила 70,13 (69,40-71,55)% (n=9, p<0,05) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения в условиях нормоксии (рисунок 8).

Величина сократительного ответа сосудистых сегментов на действие 1 мкМ фенилэфрина в условиях реоксигенации статистически значимо снизилась по сравнению с ФЭ-индуцированным сокращением гладкомышечных препаратов в условиях гипоксии.

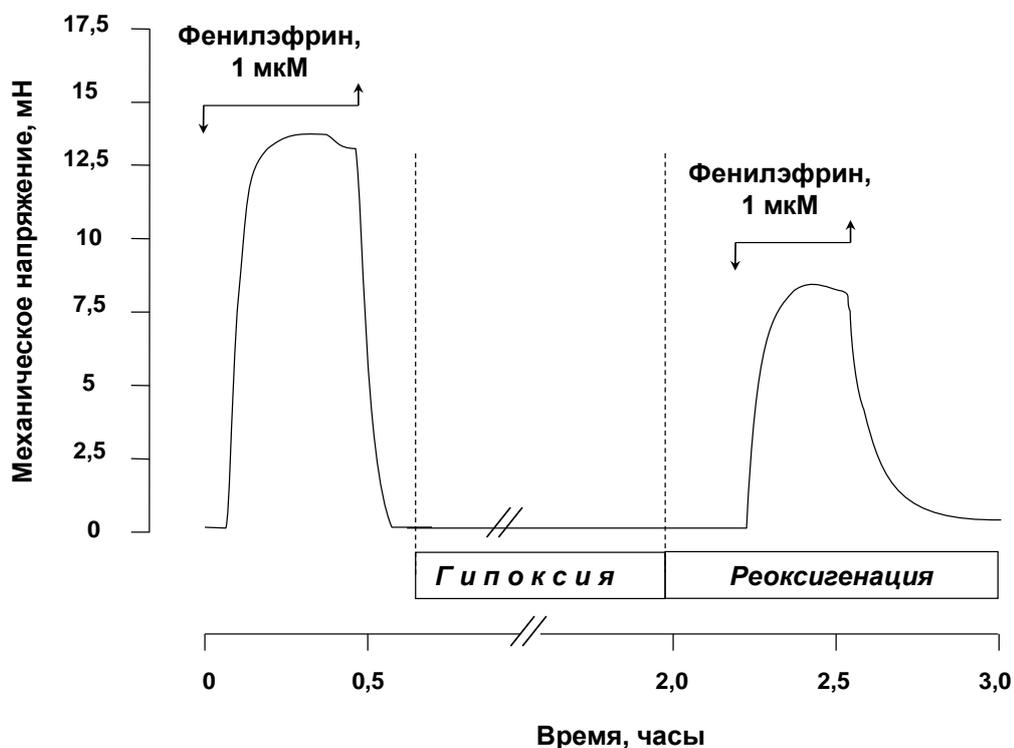


Рисунок 8. Влияние реоксигенации на амплитуду сократительного ответа гладкомышечного сегмента при действии 1 мкМ фенилэфрина.

Обозначения: как на рисунке 4.

Таким образом, в период реоксигенации, как и при гипоксии, происходило угнетение сократительных реакций ГМК аорты крысы, вызванных гиперкалиевым раствором или α_1 -адреномиметиком фенилэфрином. Причем, в наибольшей степени снижение МН сосудистых сегментов отмечалось на фоне активации α_1 -адренергических рецепторов в процессе реоксигенации (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние гипоксии и реоксигенации на сократительные ответы сосудистых гладкомышечных клеток в условиях гипоксии и реоксигенации, Me (Q₁-Q₃)

Группа	Амплитуда сокращения, %	
	Гиперкалиевое сокращение (30 мМ КСl)	Сокращение, индуцированное фенилэфрином (1 мкМ)
Нормоксия (контроль)	100	100
Гипоксия	87,18 (85,74-89,63) p ₁ <0,05	78,61 (76,64-80,48) p ₁ <0,05; p ₂ <0,05
Реоксигенация	80,48 (76,91-86,32) p ₁ <0,05; p ₂ <0,05	70,13 (69,40-71,55) p ₁ <0,05; p ₃ <0,05 p ₄ <0,05

Примечание: p₁ – статистически значимые различия по сравнению с контрольным сокращением при нормоксии; p₂ – с гиперкалиевым сокращением в условиях гипоксии; p₃ – с ФЭ-индуцированным сокращением в условиях гипоксии; p₄ – с гиперкалиевым сокращением в условиях реоксигенации.

Ослабление сократительной функции ГМК аорты крысы при гипоксии и реоксигенации может быть обусловлено изменением ионной проницаемости их мембраны. Так показано, что в условиях нарушения кислородного гомеостаза гладких мышц происходит угнетение оперирования потенциал-зависимых и/или рецептор-оперируемых Ca²⁺-каналов, обеспечивающих поступление ионов кальция в цитозоль, и, в конечном итоге, развитие сокращения [77, 121].

Кроме этого, в осуществлении процессов вазодилатации может быть задействована и калиевая проводимость мембраны ГМК [99, 124, 159, 214].

3.2. Исследование роли калиевой проводимости мембраны в механизмах действия гипоксии и реоксигенации на сократительную активность сосудистых гладких мышц

Наиболее вероятным механизмом угнетения констрикторного действия гиперкалиевого раствора и фенилэфрина на гладкие мышцы аорты крысы в условиях изменения их оксигенации является активация калиевых каналов СГМК [159, 214]. Для выявления вклада основных компонентов калиевой проводимости мембраны в реализацию вазорелаксирующих эффектов гипоксии и реоксигенации использовали блокаторы изучаемых каналов.

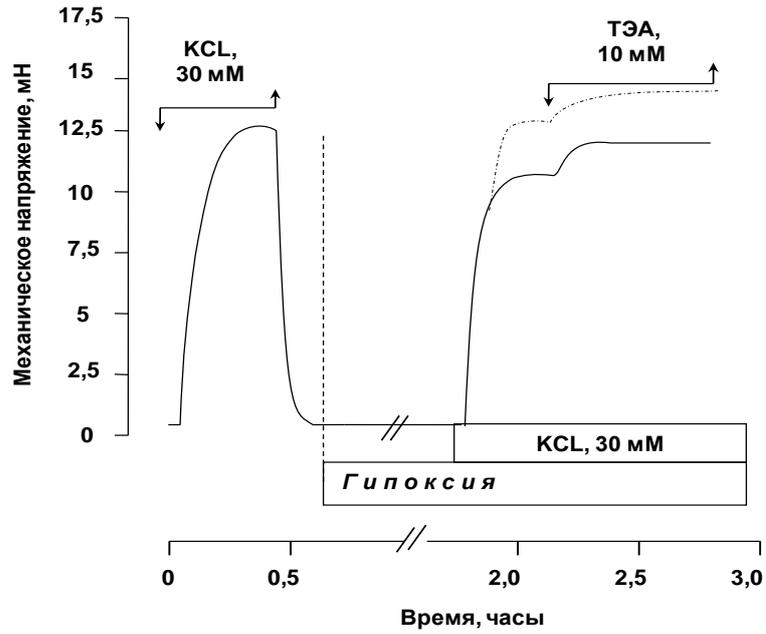
3.2.1. Влияние тетраэтиламмония на сокращения гладких мышц сосудов, вызванные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином, в условиях гипоксии и реоксигенации

Изучение влияния гипоксии и реоксигенации на проницаемость мембраны сосудистых ГМК для ионов калия производили при помощи неизбирательного блокатора калиевых каналов тетраэтиламмония хлорида (ТЭА) [132, 210].

Добавление ТЭА в концентрации 10 мМ на фоне гиперкалиевой контрактуры в условиях нормоксии вызывало достоверное увеличение амплитуды сократительного ответа гладкомышечных сегментов до 108,96 (107,68-110,62)% (n=8, p<0,05) относительно контрольного гиперкалиевого сокращения.

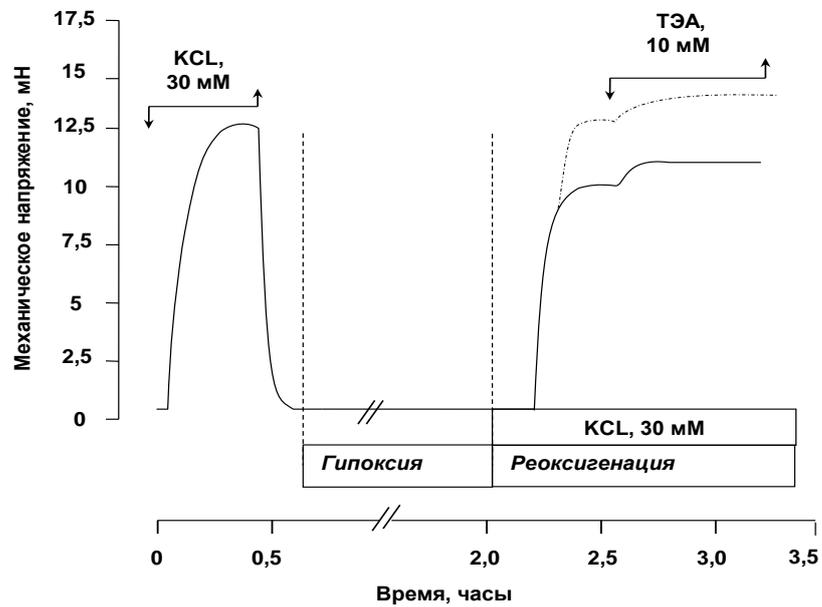
В условиях гипоксии, как и в условиях реоксигенации, аппликация 10 мМ ТЭА на фоне гиперкалиевого сокращения приводила к дополнительному приросту механического напряжения ГМК аорты. В гипооксигенированном растворе амплитуда сокращения возрастала до 116,97 (109,7-118,05)% (n=8, p<0,05), а при реоксигенации до 115,65 (110,06-117,14)% (n=8, p<0,05) относительно фоновых сокращений при гипоксии и реоксигенации, соответственно (рисунок 9).

А



----- Сокращение при действии блокатора в условиях нормоксии

Б



----- Сокращение при действии блокатора в условиях нормоксии

Рисунок 9. Влияние 10 мМ ТЭА на механическое напряжение гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором в условиях гипоксии (А) и реоксигенации (Б).

Обозначения: как на рисунке 4.

Выявлены различия между величинами МН сосудистых сегментов, предсокращенных 30 мМ хлоридом калия, в присутствии блокатора при нормоксии и в условиях модификации уровня кислорода в тестирующем растворе. Так, добавление 10 мМ ТЭА на фоне гиперкалиевого сокращения в условиях гипоксии или реоксигенации приводило к достоверно большему увеличению амплитуды сократительного ответа, чем при действии ТЭА в условиях нормоксии. Прирост же МН гладкомышечных сегментов аорты крысы, обусловленный влиянием ТЭА, при реоксигенации статистически значимо не отличался от сходного при гипоксии.

Добавление ТЭА в концентрации 10 мМ на фоне ФЭ-индуцированного сокращения в условиях нормоксии вызывало статистически значимое увеличение МН сосудистых гладкомышечных сегментов до 116,53 (115,31-118,48)% (n=9, p<0,05) относительно контрольного сокращения. Причем, сократительный эффект, вызванный α_1 -адреномиметиком в присутствии блокатора, был достоверно выше индуцированного гиперкалиевым раствором.

При гипоксии и реоксигенации ТЭА вызывал увеличение амплитуды ФЭ-индуцированного сократительного ответа ГМК аорты крысы. При этом в условиях дефицита кислорода в растворе МН гладкомышечных сегментов возрастало до 126,04 (121,88-128,82)% (n=8, p<0,05) от фонового ФЭ-индуцированного сокращения (рисунок 10, А), что также было достоверно выше, чем при действии ТЭА в условиях нормоксии.

В период реоксигенации аппликация ТЭА способствовала увеличению амплитуды ФЭ-индуцированной контрактуры до 123,49 (120,14-125,53)% (n=8, p<0,05) относительно фонового сокращения, вызванного ФЭ, в соответствующих условиях (рисунок 10, Б). Подобное констрикторное действие блокатора было достоверно выше, чем в нормоксии, однако статистически значимо не отличалось от индуцированного в гипоксических условиях.

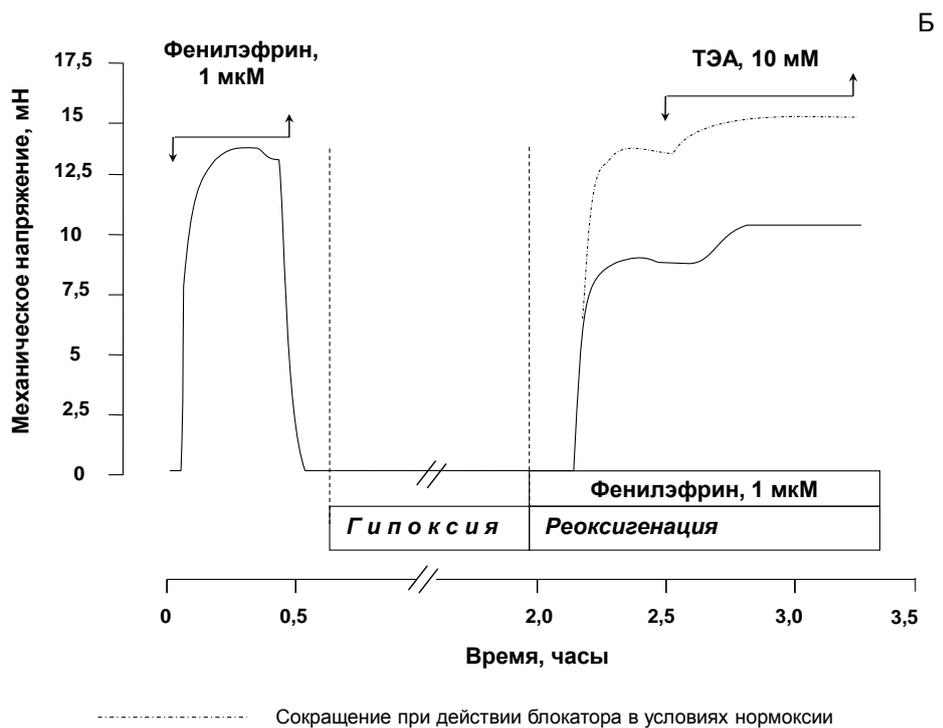
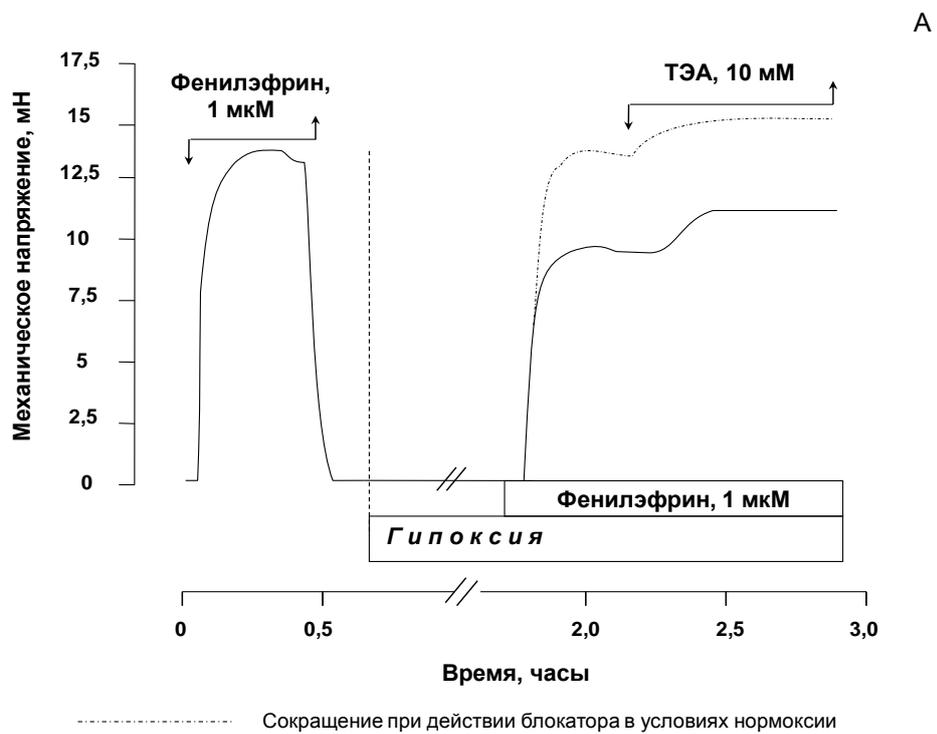


Рисунок 10. Влияние гипоксии (А) и реоксигенации (Б) на механическое напряжение гладкой мышцы аорты крысы, предсокращенной 1 мкМ фенилэфрином, в присутствии 10 мМ ТЭА.

Обозначения: как на рисунке 4.

Во всех проведенных экспериментах сократительный эффект неселективного блокатора калиевых каналов при сходных условиях развития сокращения усиливался на фоне активации α_1 -адренорецепторов фенилэфрином (таблица 3). Наблюдаемая закономерность свидетельствует о том, что при изменениях оксигенации сосудистых гладких мышц важную роль может играть природа и механизм действия предсокращающего агента.

Таблица 3 – Влияние гипоксии и реоксигенации на сократительную активность гладких мышц аорты крысы в условиях блокирования калиевых каналов тетраэтиламмонием, Me (Q₁-Q₃)

Группа	Амплитуда сокращения, %	
	Гиперкалиевое сокращение (30 мМ KCl)	Фенилэфрин-индуцированное сокращение
Нормоксия	100	100
Нормоксия + тетраэтиламмоний (10 мМ)	108,96 (107,68-110,62)	116,53 (115,31-118,48) $p_2 < 0,05$
Гипоксия + тетраэтиламмоний (10 мМ)	116,97 (109,7-118,05) $p_1 < 0,05$	126,04 (121,88-128,82) $p_1 < 0,05; p_2 < 0,05$
Реоксигенация + тетраэтиламмоний (10 мМ)	115,65 (110,06-117,14) $p_1 < 0,05$	123,49 (120,14-125,53) $p_1 < 0,05; p_2 < 0,05$

Примечание: p_1 – статистически значимые различия по сравнению с нормоксическим сокращением в присутствии блокатора; p_2 – с гиперкалиевым сокращением в присутствии блокатора при тех же условиях.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что одним из эффекторных механизмов регуляции сократительной активности ГМК аорты крысы при гипоксии и реоксигенации может выступать повышение калиевой проводимости мембран гладких мышц, вероятно, за счет открывания потенциал-зависимых и/или Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов [203, 214].

3.2.2. Роль потенциал-зависимых калиевых каналов мембраны в реализации сокращений гладкомышечных клеток, вызванных гиперкалиевым раствором или фенилэфрином, в условиях гипоксии и реоксигенации

Избирательный блокатор потенциал-зависимых (K_v)-каналов – 4-аминопиридин (4-АП) в концентрации 1 мМ в нормоксических условиях статистически значимо увеличивал механическое напряжение сосудистых гладкомышечных сегментов, предсокращенных 30 мМ хлоридом калия, до 107,76 (104,59-110,72)% (n=8, p<0,05) относительно контрольного гиперкалиевого сокращения.

Добавление 1 мМ блокатора при действии гиперкалиевого раствора Кребса в условиях гипоксии вызывало увеличение амплитуды сократительного ответа ГМК аорты крысы до 115,05 (112,29-118,41)% (n=8, p<0,05) от фонового гипоксического сокращения. Причем, в условиях гипоксии 4-АП способствовал достоверно большему приросту МН гладкомышечных сегментов, чем при нормоксии.

При реоксигенации 4-АП также оказывал констрикторный эффект на сосудистые гладкомышечные сегменты, деполяризованные 30 мМ хлоридом калия. Амплитуда сокращения ГМК составила 114,41 (111,96-119,6)% (n=8, p<0,05) относительно фоновой гиперкалиевой контрактуры в реоксигенационных условиях (рисунок 11). По сравнению с условиями нормоксии при реоксигенации блокатор способствовал достоверно большему увеличению мышечного напряжения сосудистых сегментов, предсокращенных гиперкалиевым раствором.

Однако не было выявлено статистически значимых различий между действием 4-АП в условиях гипоксии и реоксигенации. Это может свидетельствовать о том, что в период реоксигенации не происходит дополнительного усиления калиевой проводимости мембраны ГМК аорты крысы.

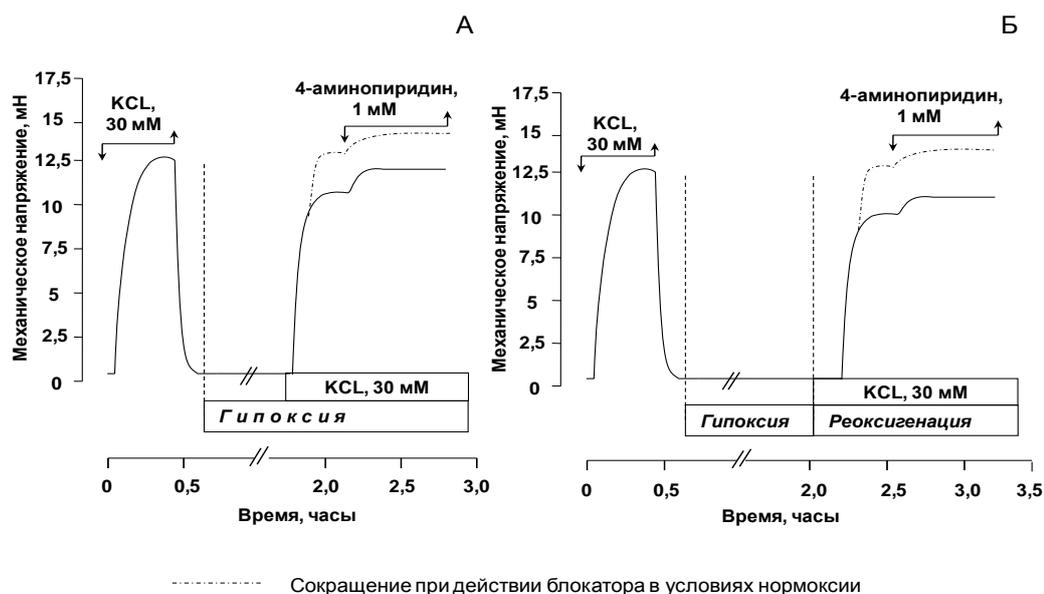


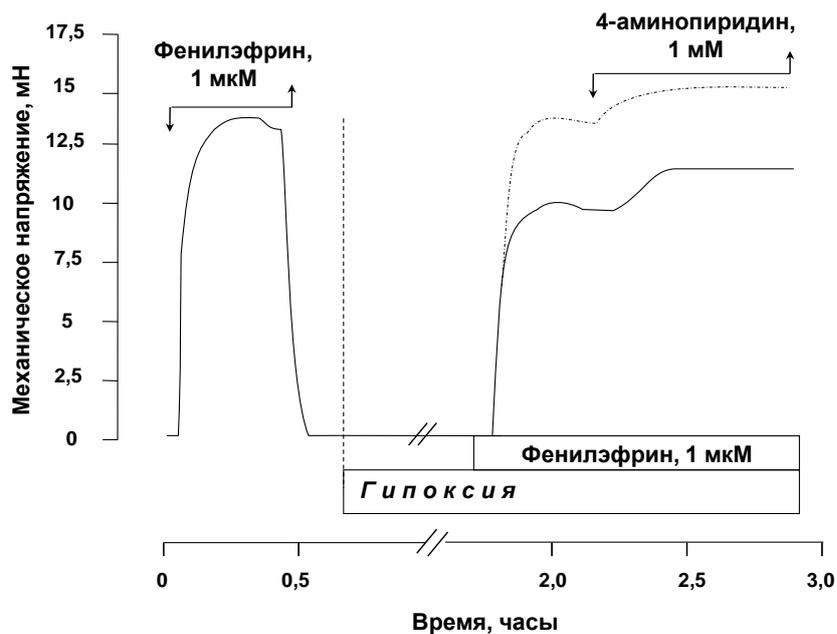
Рисунок 11. Влияние гипоксии (А) и реоксигенации (Б) на сокращения гладкомышечного сегмента аорты крысы, вызванные гиперкалиевым раствором, в присутствии 1 мМ 4-аминопиридина.

Обозначения: как на рисунке 4.

При действии селективного блокатора потенциал-зависимых калиевых каналов на ФЭ-индуцированное сокращение в условиях нормоксии наблюдалось увеличение МН сосудистых сегментов до 117,64 (115,86-118,96)% ($n=8$, $p<0,05$) от контрольного сокращения.

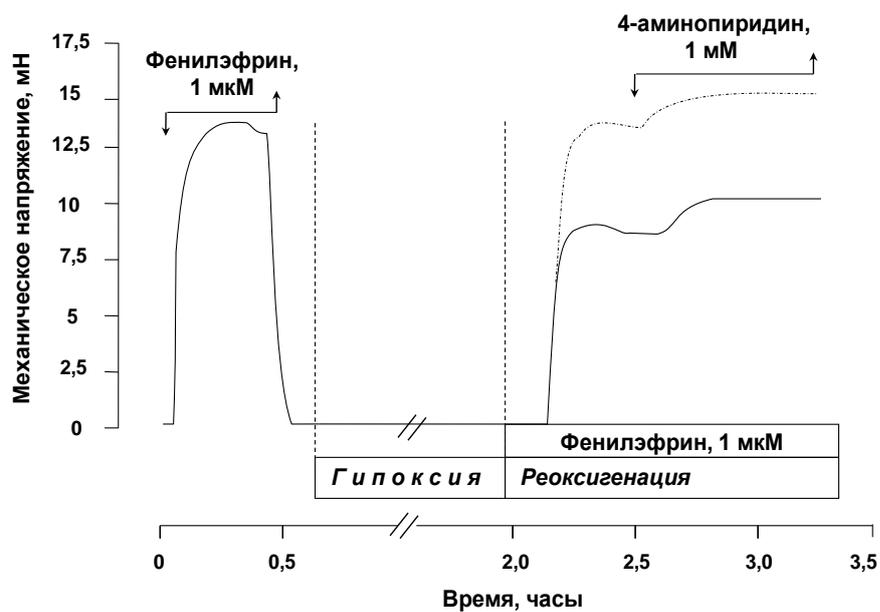
Аппликация 4-АП на фоне ФЭ-индуцированной контрактуры в условиях гипоксии приводила к увеличению амплитуды сократительного ответа ГМ до 125,44 (121,89-127,82)% ($n=8$, $p<0,05$) от фонового сокращения при гипоксии (рисунок 12, А). Данный эффект блокатора в условиях гипоксии был статистически значимо выше, чем аналогичный при нормоксии. При реоксигенации 4-АП вызывал достоверное увеличение МН гладкомышечных сегментов, предобработанных ФЭ, до 122,88 (119,14-125,14)% ($n=8$, $p<0,05$) относительно фонового сокращения в период реоксигенации (рисунок 12, Б).

А



----- Сокращение при действии блокатора в условиях нормоксии

Б



----- Сокращение при действии блокатора в условиях нормоксии

Рисунок 12. Влияние гипоксии (А) и реоксигенации (Б) на механическое напряжение ГМК аорты крысы, предсокращенных фенилэфрином (1 мкМ), при действии 1 мМ 4-аминопиридина.

Обозначения: как на рисунке 4.

Констрикторный эффект 4-АП в условиях реоксигенации статистически значимо усиливался по сравнению с аналогичным при нормоксии, но не отличался от индуцируемого в гипоксигенированном растворе (рисунок 13). При этом установлено, что эффект блокатора при сходных условиях развития сокращения усиливался на фоне действия фенилэфрина.

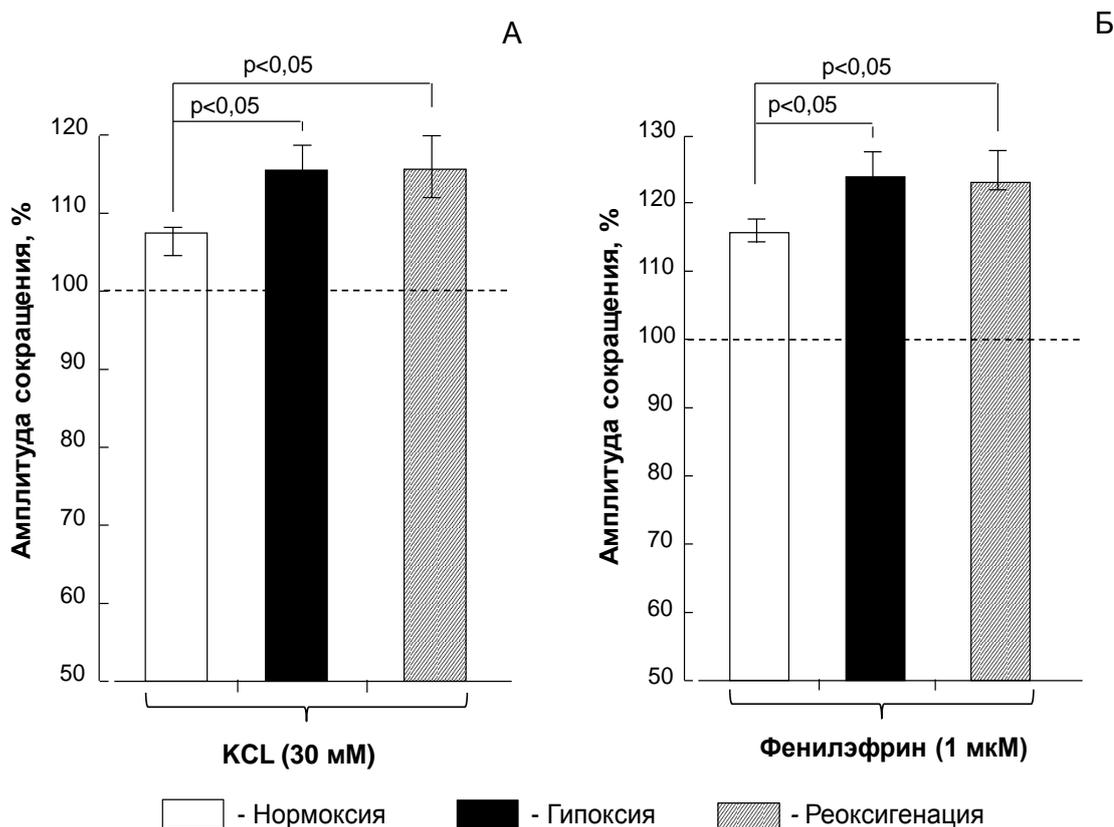


Рисунок 13. Изменения амплитуды сокращений ГМК аорты крысы, вызванных гиперкалиевым раствором (А) или фенилэфрином (Б), в присутствии 4-аминопиридина (1 мМ) при гипоксии и реоксигенации.

Обозначения: $p < 0,05$ – статистически значимые различия.

Полученные данные указывают на то, что регуляция сократительной активности СГМК при гипоксии и реоксигенации связана с оперированием потенциал-зависимого компонента калиевой проводимости мембраны. Повышение проводимости K_v -каналов приводит к расслаблению гладких мышц сосудов при изменении их оксигенации.

3.2.3. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов в механизмах сокращений сосудистых гладких мышц, индуцированных гиперкалиевым раствором или фенилэфрином, в условиях гипоксии и реоксигенации

Для исследования вклада АТФ-чувствительного компонента калиевой проводимости мембраны ГМК в эффекты гипоксии и реоксигенации на изменение сократительной активности ГМК сосудов использовали селективный блокатор K_{ATP} -каналов – глибенкламид (ГБ).

В нормоксических условиях ГБ в концентрации 10 мкМ статистически значимо не влиял на величину МН гладкомышечных сегментов, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса. Амплитуда сокращений ГМК составила 102,26 (100,62-104,63)% (n=8, p>0,05) относительно контрольного гиперкалиевого сокращения. Аналогичное действие блокатор оказывал при действии в условиях гипоксии и реоксигенации (таблица 4).

Таблица 4 – Влияние глибенкламида на сокращения ГМК аорты крысы, индуцированные гиперкалиевым раствором, Me (Q₁-Q₃)

Группа	Амплитуда гиперкалиевого (30 мМ КСl) сокращения, %
Нормоксия	100
Нормоксия +глибенкламид (10 мкМ)	102,26 (100,62-104,63)
Гипоксия + глибенкламид (10 мкМ)	104,41 (101,29-107,76)
Реоксигенация + глибенкламид (10 мкМ)	100,22 (97,66-101,305)

Также не было выявлено достоверных различий между эффектами ГБ на изменение амплитуды гиперкалиевого сокращения сосудистых гладкомышечных сегментов при нормоксии и в условиях модификации уровня кислорода в омывающем растворе (рисунок 14).

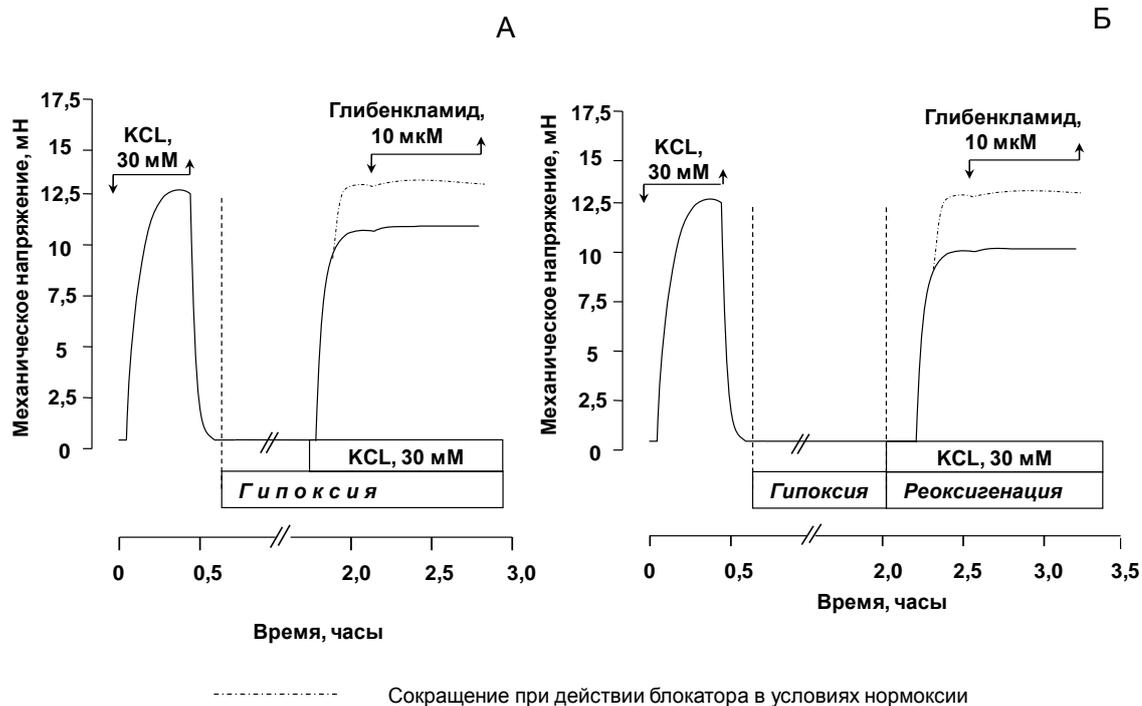


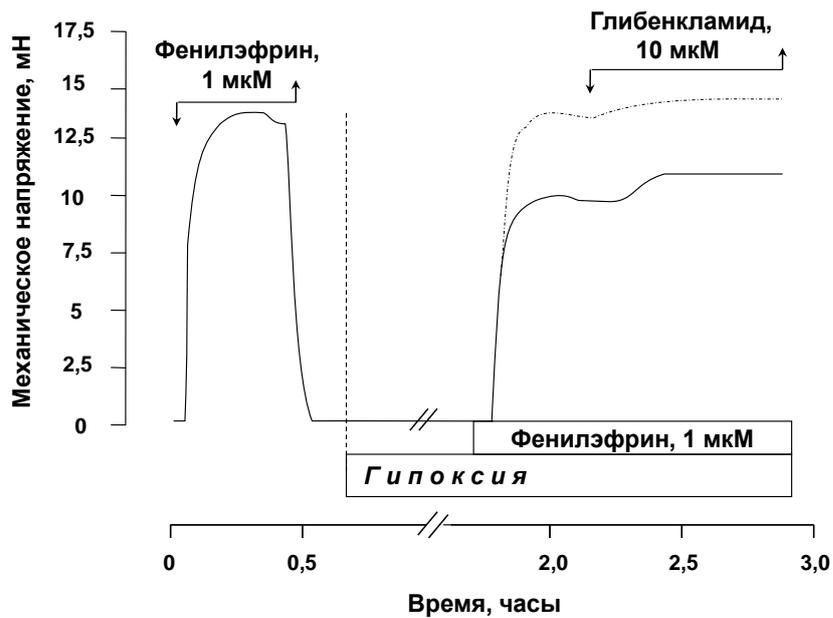
Рисунок 14. Влияние гипоксии (А) и реоксигенации (Б) на механическое напряжение гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором, на фоне действия 10 мкМ глибенкламида.

Обозначения: как на рисунке 4.

Аппликация 10 мкМ ГБ на фоне сокращения, индуцированного ФЭ, в условиях нормоксии приводила к увеличению амплитуды сократительного ответа ГМК до 105,86 (102,97-107,63) (n=8, p>0,05) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения.

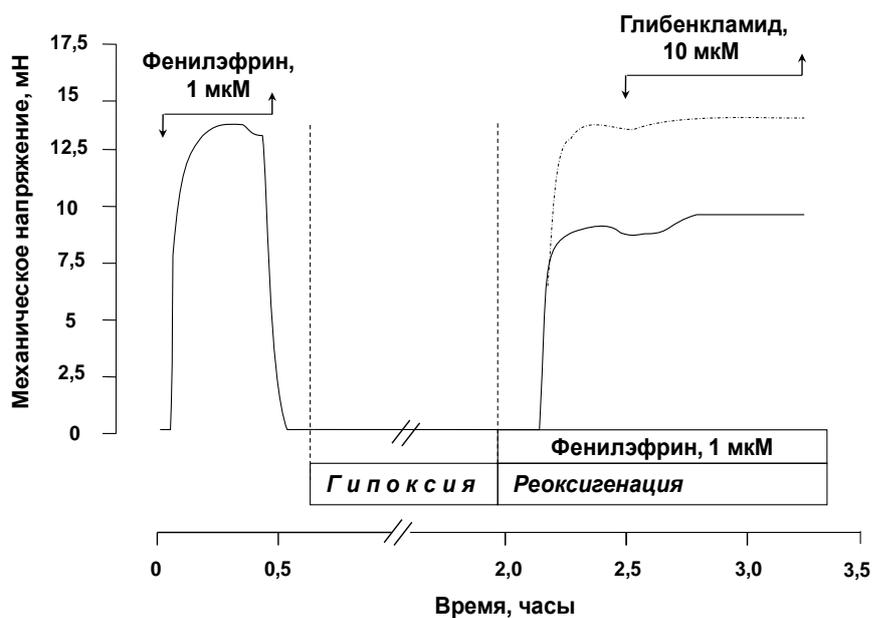
В условиях гипоксии и реоксигенации блокатор также вызывал дополнительный прирост МН сосудистых гладкомышечных сегментов, предсокращенных ФЭ, до 114,36 (110,64-116,04)% (n=8, p<0,05) и 112,61 (109,46-114,99)% (n=8, p<0,05), соответственно, относительно фоновых сокращений при данных условиях (рисунок 15).

А



----- Сокращение при действии блокатора в условиях нормоксии

Б



----- Сокращение при действии блокатора в условиях нормоксии

Рисунок 15. Влияние гипоксии и реоксигенации на механическое напряжение сосудистых сегментов, предсокращенных фенилэфрином, на фоне действия 10 μM глибенкламида при гипоксии (А) и реоксигенации (Б).

Обозначения: как на рисунке 4.

Причем, в период гипоксии и реоксигенации наблюдалось усиление констрикторного эффекта блокатора по сравнению с нормоксией. Однако статистически значимых различий между изменениями амплитуды ФЭ-индуцированных сокращений при реоксигенации и гипоксии в присутствии ГБ не было выявлено. На фоне действия ФЭ блокатор вызывал достоверно больший прирост МН сосудистых сегментов, чем при действии на ГМК, предсокращенные гиперкалиевым раствором (рисунок 16).

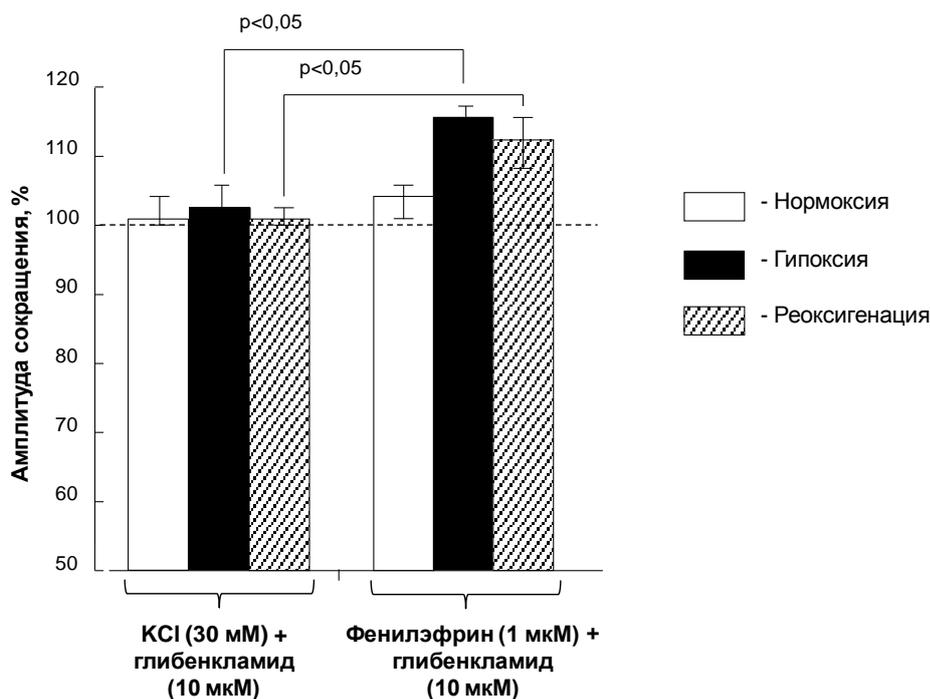


Рисунок 16. Изменение амплитуды сократительного ответа сосудистых гладкомышечных сегментов, индуцированного гиперкалиевым раствором и фенилэфрином, в присутствии 10 мкМ глибенкламида.

Обозначения: $p < 0,05$ – статистически значимые различия.

Таким образом, в условиях гипоксии и реоксигенации на фоне действия α_1 -адреномиметика фенилэфрина, но не гиперкалиевого раствора, снижение сократительной функции гладкомышечных сегментов аорты крысы может быть обусловлено повышением проводимости АТФ-чувствительных калиевых каналов.

3.2.4. *Определение относительного вклада различных типов калиевых каналов в релаксирующее действие гипоксии и реоксигенации на сосудистые гладкие мышцы*

Количественное выражение вклада исследуемых типов калиевых каналов в механизмы расслабления сосудистых гладкомышечных сегментов, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса или фенилэфрином, при гипоксии и реоксигенации рассчитывали по формуле (1). Полученные результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Относительный вклад калиевых каналов в механизмы релаксирующего действия гипоксии и реоксигенации на сократительную функцию ГМК аорты крысы

Блокатор	Относительная величина	
	Гиперкалиевое сокращение	Фенилэфрин-индуцированное сокращение
	<i>Гипоксия</i>	
Тетраэтиламмоний (10 мМ)	0,46	0,4
4-аминопиридин (1 мМ)	0,42	0,38
Глибенкламид (10 мкМ)	0,12	0,22
	<i>Реоксигенация</i>	
Тетраэтиламмоний (10 мМ)	0,51	0,4
4-аминопиридин (1 мМ)	0,48	0,39
Глибенкламид (10 мкМ)	0,01	0,21

Согласно представленным данным снижение сократительной активности сосудистых гладких мышц при гипоксии и реоксигенации обусловлено преимущественно активацией калиевых каналов, чувствительных к ТЭА и 4-аминопиридину.

По-видимому, потенциал-зависимый и/или Ca^{2+} -активируемый компоненты калиевой проводимости мембраны ГМК аорты крысы вносят основной вклад в механизмы расслабления гладких мышц, предсокращенных гиперкалиевым раствором или фенилэфрином, в условиях гипоксии и

реоксигенации. Полученные результаты согласуются с современными представлениями об участии Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов высокой (BK_{Ca}) [145, 203, 214], а также потенциал-зависимых K^+ -каналов [142] в процессах релаксации сосудистых ГМК при изменении их оксигенации. Также известно, что ТЭА в концентрации 10 мМ в большей степени блокирует K_v -каналы мембраны ГМК (типы K_v7 , $\text{K}_v2.1$) [141, 142], тогда как до 1 мМ – Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы [203]. 4-АП, в свою очередь, в миллимолярных концентрациях блокирует преимущественно $\text{K}_v1.8$, $\text{K}_v2.2$, $\text{K}_v3.3$, $\text{K}_v4.1-3$ [180].

Наряду с указанными K^+ -каналами в механизмах регуляции сократительной функции гладких мышц аорты крысы при гипоксии и реоксигенации в случае действия фенилэфрина задействованы и АТФ-чувствительные K^+ -каналы ($\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналы). $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналы многими исследователями рассматриваются в качестве наиболее вероятной мишени действия при возникающих нарушениях кислородного гомеостаза [91, 99, 159]. В наших исследованиях подобные данные подтвердились только в отношении гладкомышечных сегментов, предсокращенных α_1 -адреномиметиком. Это, отчасти, может быть связано с тем, что исследовалось в основном действие глибенкламида как блокатора этих калиевых каналов, который, возможно, оказался неспособным предотвратить или устранить функциональные нарушения при гипоксии и реоксигенации.

К тому же, весьма затруднительно идентифицировать и дифференцировать прямое влияние низкого напряжения кислорода на АТФ-чувствительные K^+ -каналы, учитывая их небольшую плотность распределения (~300 $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналы/клетку в сосудистых ГМК против ~50,000 каналов/клетку в кардиомиоцитах) и неоднозначное отношение к уровню АТФ в клетке [180].

3.3. Исследование влияния активности Na^+, K^+ -АТФазы и гипоксии на внутриклеточное содержание моновалентных катионов

В основе процессов сопряжения сокращение-расслабление гладких мышц, как известно, лежит изменение цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} , а регуляция сократительной активности ГМК во многом зависит от метаболизма данных ионов. Наряду с этим, модулирующее влияние на общепринятые механизмы развития сократительного ответа ГМК могут оказывать не только моновалентные катионы калия (K^+), но и натрия (Na^+), равновесное распределение которых между вне- и внутриклеточной средой клеток поддерживается Na^+, K^+ -АТФазой [19, 169, 170].

Подавление синтеза макроэргов в условиях дефицита кислорода вызывает угнетение работы данного энергозависимого ионного насоса, осуществляющего транспорт катионов против градиента концентрации. Это приводит, в конечном итоге, к возникновению ионного дисбаланса, связанного с повышением внутриклеточной концентрации ионов Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$), снижением содержания ионов K^+ ($[\text{K}^+]_i$) [122, 126, 222].

Использование убаина (алкалоида растительного происхождения, специфического ингибитора Na^+, K^+ -АТФазы) или же инкубация ГМК аорты крысы в бескальциевой среде, позволяет воспроизводить эффекты гипоксии на ион-транспортирующие системы.

Показано, что 6-часовое ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы сосудистых ГМК убаином приводило к достоверному увеличению $[\text{Na}^+]_i$ с 15-20 до 130 мМ и снижению $[\text{K}^+]_i$ с 150 до 25 мМ по сравнению с контролем (рисунок 17). Аналогичное увеличение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ было обнаружено и в экспериментах с 6-часовым ингибированием Na^+, K^+ -АТФазы в бескальциевой среде.

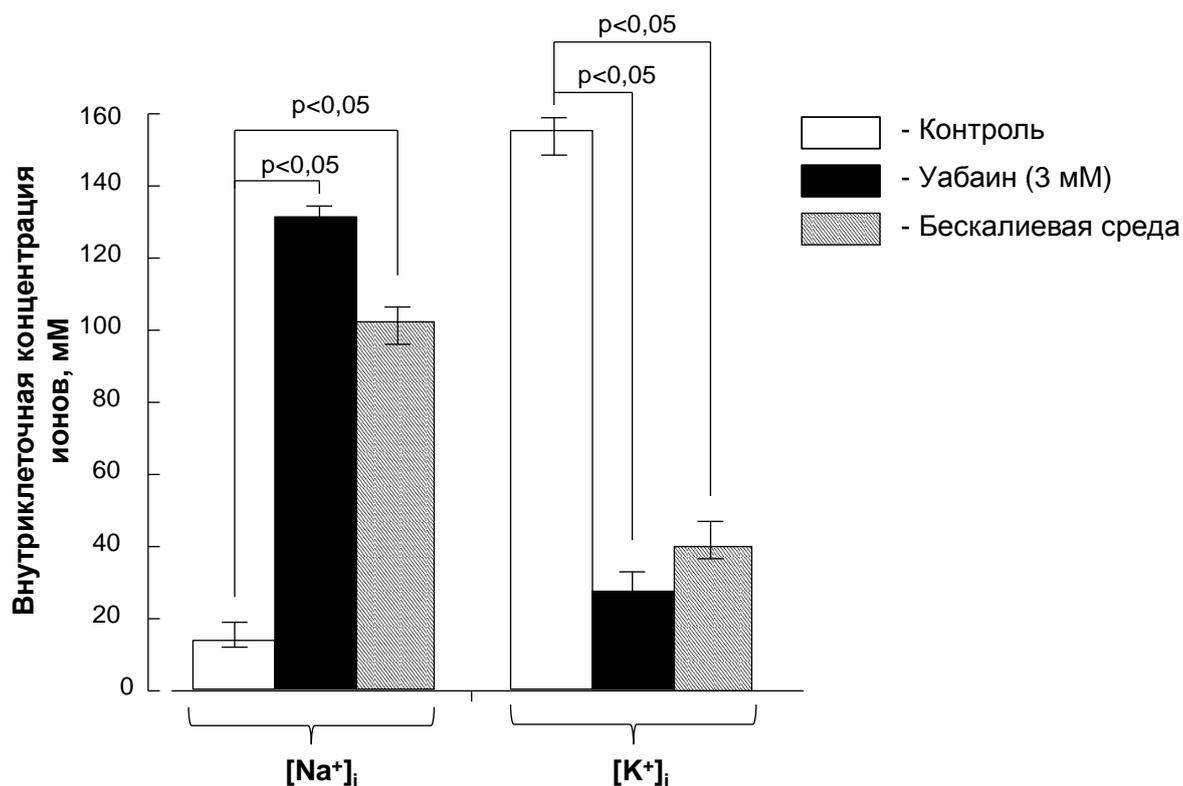


Рисунок 17. Изменение внутриклеточного содержания моновалентных катионов в гладкомышечных клетках аорты крысы при различных условиях культивирования.

Обозначения: $p < 0,05$ – статистически значимые различия.

24-часовая инкубация СГМК в условиях гипоксии приводила к снижению внутриклеточного содержания АТФ ($[АТФ]_i$) в 3 раза по сравнению с контролем, тогда как убаин хоть и ослаблял этот параметр менее, чем на 20%, статистически значимо не влиял на изменение $[АТФ]_i$.

В условиях гипоксии наблюдалось увеличение концентрация $[Na^+]_i$ в 3 раза, тогда как $[K^+]_i$, наоборот, снижалась 2 раза относительно контроля (рисунок 18).

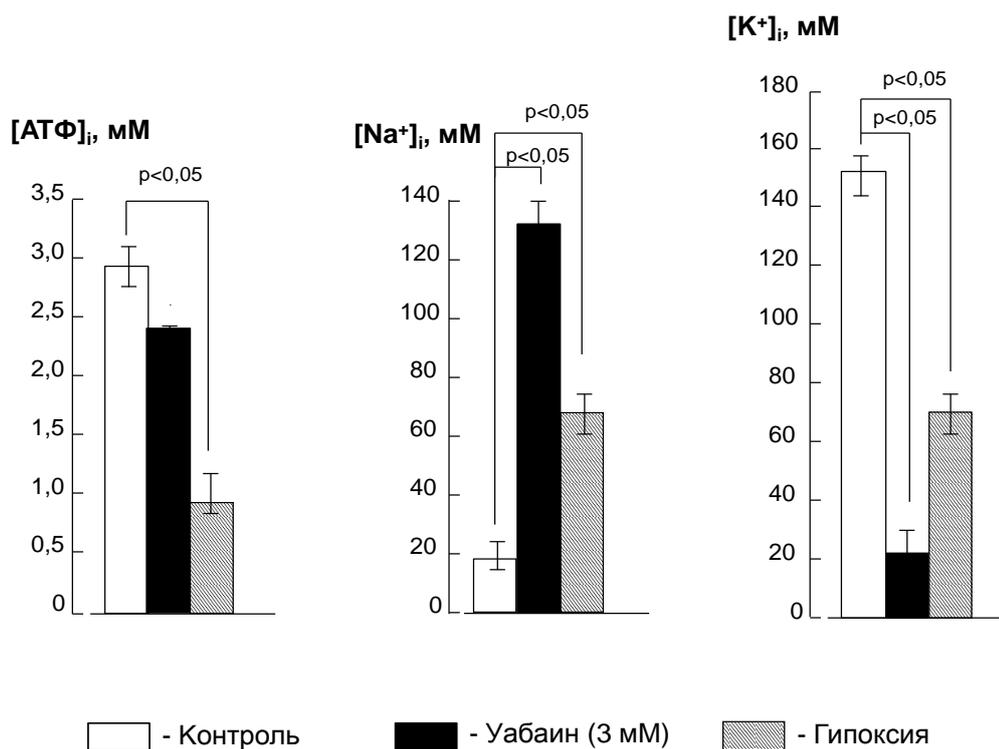


Рисунок 18. Изменение внутриклеточной концентрации АТФ и моновалентных катионов в гладкомышечных клетках аорты крысы в гипернатриевой ($[Na^+]_0/[K^+]_0 = 140/5$ мМ) среде.

Обозначения: $p < 0,05$ – статистически значимые различия.

Полученные данные позволяют утверждать, что в условиях дефицита кислорода в сосудистых ГМК происходит снижение ресурсов макроэргов, сопровождающееся, возможно, не только угнетением работы Na^+, K^+ -АТФазы, но и других АТФ-зависимых процессов, лежащих в основе цикла сокращения-расслабления гладких мышц. Возникающий при этом дисбаланс внутриклеточных моновалентных катионов, вероятно, опосредованно влияет на функционирование ион-транспортирующих систем ГМК.

3.4. Изучение влияния газотрансммиттеров на сократительную функцию гладких мышц аорты крысы при действии гипоксии и реоксигенации

Предполагается, что газовые посредники, такие как монооксид углерода (CO) и сероводород (H₂S), действуя через различные мембранные и молекулярные клеточные механизмы, принимают активное участие в модуляции сократительной активности сосудистых гладких мышц и могут служить газовыми сенсорами при нарушении их оксигенации.

3.4.1. Влияние монооксида углерода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы в условиях гипоксии и реоксигенации

Для изучения роли монооксида углерода в механизмах регуляции сократительной функции сосудистых гладких мышц в условиях гипоксии и реоксигенации использовали его донор tricarbonyldichlororuthenium(II)-dimer (CORM-2).

Донор исследуемого газомедиатора в концентрациях от 1 до 1000 мкМ не оказывал влияния на исходное механическое напряжение ГМК аорты крысы. Однако аппликация CORM-2 в этом же диапазоне концентраций на фоне гиперкалиевой контрактуры ГМК, индуцированной в условиях нормоксии, приводила к дозозависимому снижению МН гладкомышечных препаратов (рисунок 19). При этом расслабление, близкое к полумаксимальному, наблюдалось в ответ на действие CORM-2 в концентрации 100 мкМ: амплитуда сократительного ответа гладких мышц составила 57,12 (53,9-61,24)% (n=6, p<0,05) от контрольного гиперкалиевого сокращения.

В условиях нормоксии на фоне сокращений ГМК, вызванных 1 мкМ α_1 -адреномиметика ФЭ, добавление донора CO в концентрациях от 1 до 1000 мкМ приводило также к дозозависимому снижению сократительной реакции сосудистых гладкомышечных сегментов (рисунок 20). При этом расслабление, близкое к полумаксимальному, наблюдалось в ответ на

действие CORM-2 в концентрации 10 мкМ: амплитуда сократительного ответа сосудистых сегментов составила 58,35 (52,6-67,41)% от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения.

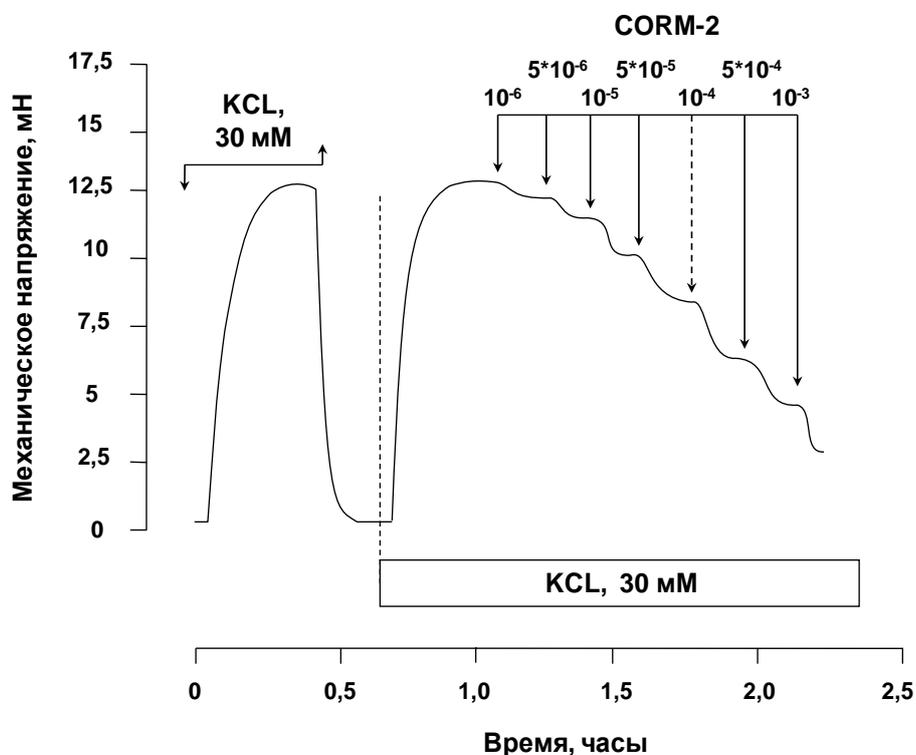


Рисунок 19. Влияние CORM-2 на механическое напряжение гладких мышц аорты крысы, предсокращенных гиперкалиевым (30мМ KCl) раствором.

Обозначения: как на рисунке 4. Пунктирной линией показано добавление CORM-2 в концентрации 100 мкМ.

Таким образом, в случае использования в качестве предсокращающего агента агониста α_1 -адренорецепторов ФЭ концентрация донора CO, обеспечивающая полумаксимальный релаксирующий эффект, была на порядок ниже.

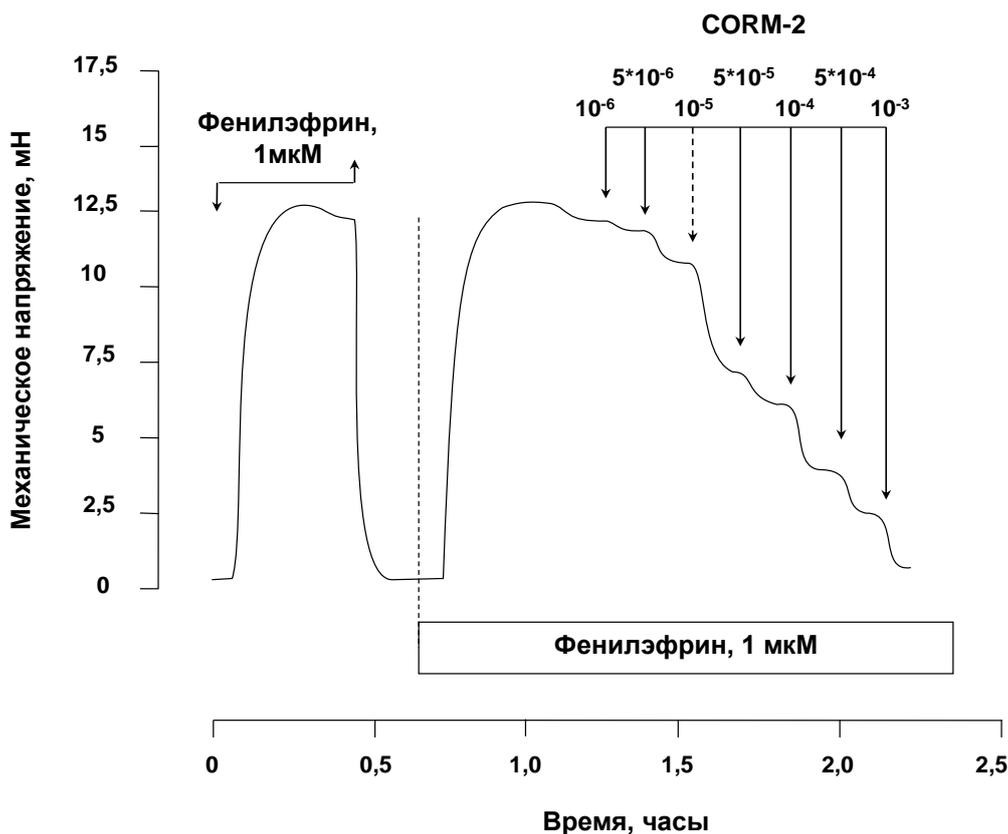
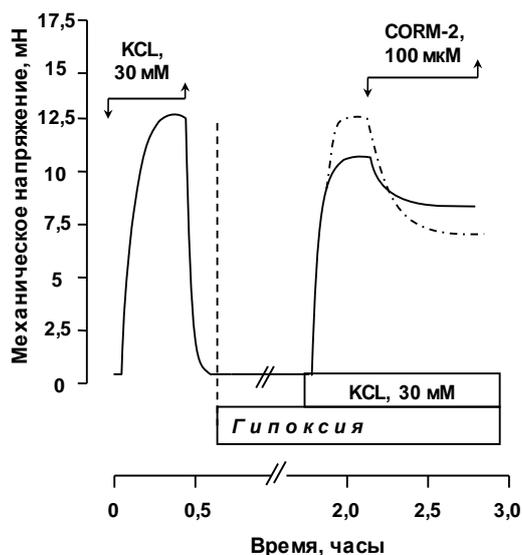


Рисунок 20. Влияние CORM-2 на механическое напряжение гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного 1 мкМ фенилэфрина.

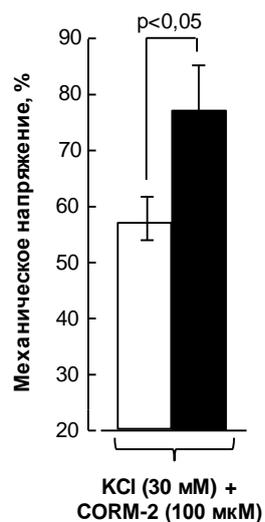
Обозначения: как на рисунке 4. Пунктирной линией показано добавление CORM-2 в концентрации 10 мкМ.

В условиях гипоксии и реоксигенации донор CO в концентрации 100 мкМ вызывал угнетение сократительной реакции гладкомышечных сегментов, индуцированной 30 мМ хлоридом калия. Амплитуда сокращений ГМК снижалась до 78,12 (73,36-84,92)% (n=9, p<0,05) и 80,3 (74,2-83,91)% (n=9, p<0,05), соответственно от фоновых значений при гипоксии и реоксигенации (рисунок 21).

А

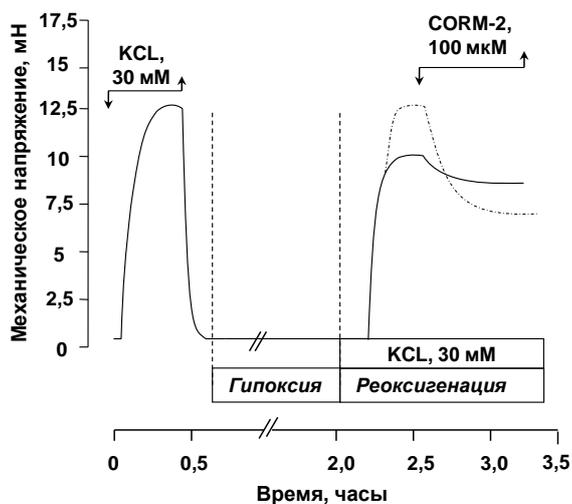


----- Сокращение при действии донора в условиях нормоксии

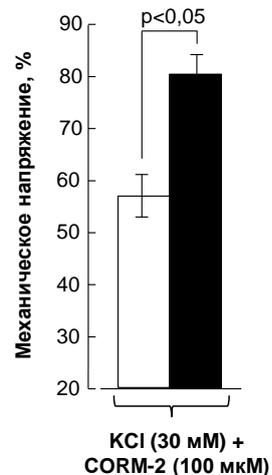


□ - Нормоксия ■ - Гипоксия

Б



----- Сокращение при действии донора в условиях нормоксии



□ - Нормоксия ■ - Реоксигенация

Рисунок 21. Влияние донора CO на сократительную реакцию гладких мышц аорты крысы, вызванную гиперкалиевым раствором, в условиях гипоксии (А) и реоксигенации (Б).

Обозначения: как на рисунке 4. $p < 0,05$ – статистически значимые различия.

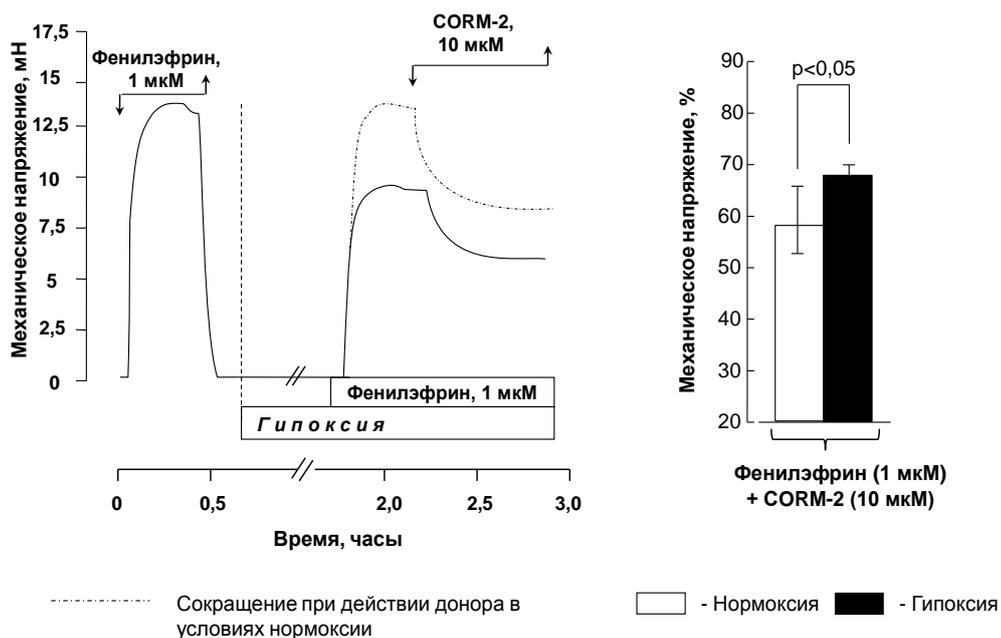
При добавлении 10 мкМ CORM-2 на фоне ФЭ-индуцированного сокращения ГМК в условиях гипоксии наблюдалось статистически значимое снижение амплитуды сократительного ответа до 68,63 (66,02-69,65)% (n=9, p<0,05) по сравнению с фоновым гипоксическим сокращением (рисунок 22, А). В период реоксигенации CORM-2 в концентрации 10 мкМ также вызвал угнетение сократительной реакции, вызванной действием 1 мкМ ФЭ: величина МН сосудистых ГМК составила 67,61 (64,71-70,89)% (n=9, p<0,05) от фонового в данных условиях (рисунок 22, Б).

Установлено, что при изменении оксигенации CORM-2 способствовал меньшему расслаблению сосудистых сегментов, предсокращенных 30 мМ раствором хлорида калия или ФЭ, чем в нормоксии, хотя величина его релаксирующего эффекта значимо не различалась в гипоксических и реоксигенационных условиях.

Полученные результаты также указывают на то, что в период действия гипоксии или реоксигенации CORM-2 в большей степени угнетал сокращения гладкомышечных препаратов, вызванные фенилэфрином, чем хлоридом калия. Это может быть обусловлено более сложной организацией процессов, запускаемых при возбуждении α_1 -адренорецепторов в ГМК. Набор и последовательность открывания ионных каналов, участие обеих ветвей кальциевой сигнальной системы, наличие прямых и обратных связей (положительных и отрицательных) делает ФЭ-индуцированное сокращение в целом или в отдельных звеньях цепи развития и поддержания сократительного ответа более уязвимыми к действию СО.

Наряду с этим, ослабление релаксирующих эффектов монооксида углерода на фоне гиперкалиевой и ФЭ-зависимой контрактуры в условиях гипоксии и реоксигенации может быть связано и с возникновением конкуренции за общую внутриклеточную эффекторную мишень или же прямым ингибирующим действием СО на различные молекулярные механизмы активации сокращения.

А



Б

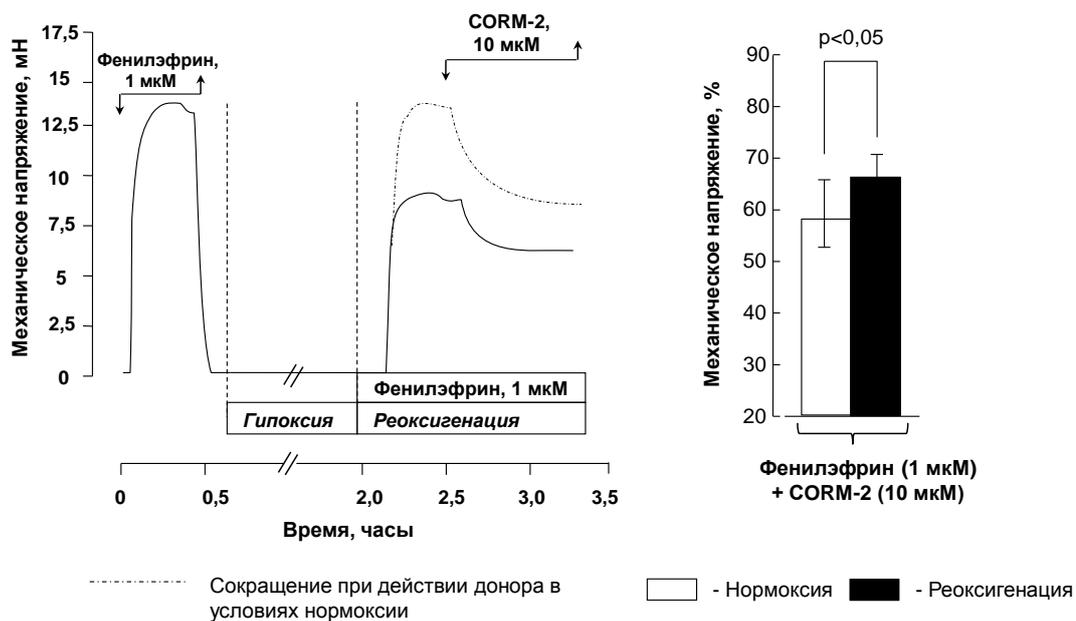


Рисунок 22. Изменение механического напряжения гладкомышечных сегментов аорты крысы, предсокращенных 1 мкМ фенилэфрина, при действии CORM-2 (10 мкМ) в условиях гипоксии (А) и реоксигенации (Б).

Обозначения: как на рисунке 4. $p < 0,05$ – статистически значимые различия.

3.4.2. Влияние сероводорода на сократительную функцию гладкомышечных клеток аорты крысы в условиях гипоксии и реоксигенации

Исследование воздействия сероводорода на сократительную активность сосудистых гладкомышечных сегментов при гипоксии и реоксигенации выполняли при помощи его донора – гидросульфида натрия (NaHS), способного в водном растворе диссоциировать с образованием HS⁻ и H₂S.

Гидросульфид натрия в концентрациях от 1 до 1000 мкМ не влиял на исходное механическое напряжение гладких мышц аорты крысы. Однако оказывал разнонаправленные эффекты на сократительную реакцию гладкомышечных сегментов, индуцированную в условиях нормоксии гиперкалиевым раствором Кребса. При этом в концентрациях 1-50 мкМ донор H₂S вызывал дополнительный прирост МН, 500 и 1000 мкМ – расслабление сосудистых ГМК. При действии 100 мкМ NaHS наблюдался двухфазный ответ: увеличение амплитуды гиперкалиевого сокращения ГМК с последующим его угнетением (рисунок 23).

В связи с этим, в дальнейших экспериментах исследовали изменение релаксирующего эффекта NaHS в концентрации 500 мкМ, вызывающего снижение амплитуды гиперкалиевой контрактуры до 63,25 (50,2-69,77)% от контрольного сокращения.

В условиях нормоксии на фоне сокращений ГМК аорты крысы, вызванных 1 мкМ ФЭ, аппликация гидросульфида натрия в концентрациях от 1 до 1000 мкМ приводила к дозозависимому угнетению сократительной активности сосудистых гладкомышечных сегментов (рисунок 24). Полумаксимальный расслабляющий эффект при этом наблюдался в ответ на действие NaHS в концентрации 100 мкМ: амплитуда сократительного ответа ГМК составила 58,55 (51,6-60,35)% (n=6, p<0,05) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения.

Таким образом, характер изменений механического напряжения гладкомышечных сегментов аорты крысы зависит не только от действующей концентрации донора H_2S , но и от способа генерации их сокращений.

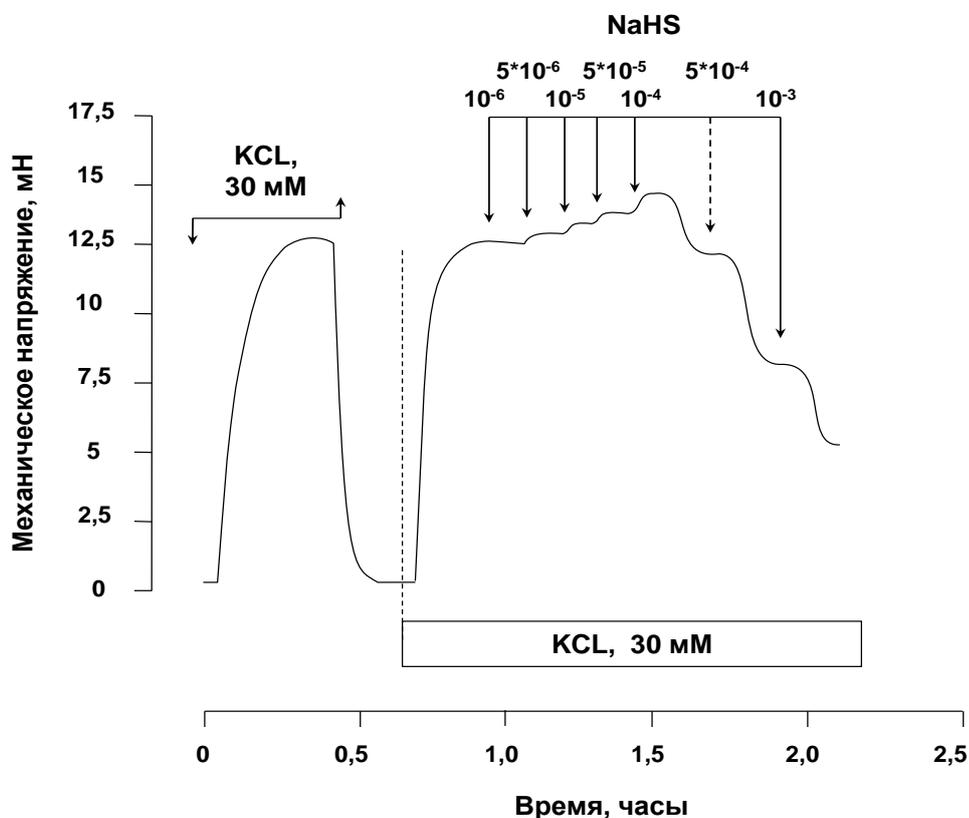


Рисунок 23. Влияние NaHS на механическое напряжение сосудистых гладких мышц, предсокращенных гиперкалиевым (30мМ KCl) раствором.

Обозначения: как на рисунке 4. Пунктирной линией показано добавление NaHS в концентрации 500 мкМ.

В условиях гипоксии и реоксигенации NaHS в концентрации 500 мкМ вызывал расслабление гладкомышечных сегментов, деполяризованных гиперкалиевым раствором Кребса. Амплитуда сокращений ГМК снижалась до 72,7 (67,28-79,6)% ($n=8$, $p<0,05$) и 75,72 (69,31-78,37)% ($n=8$, $p<0,05$), соответственно от фоновых значений при гипоксии и реоксигенации (рисунок 25).

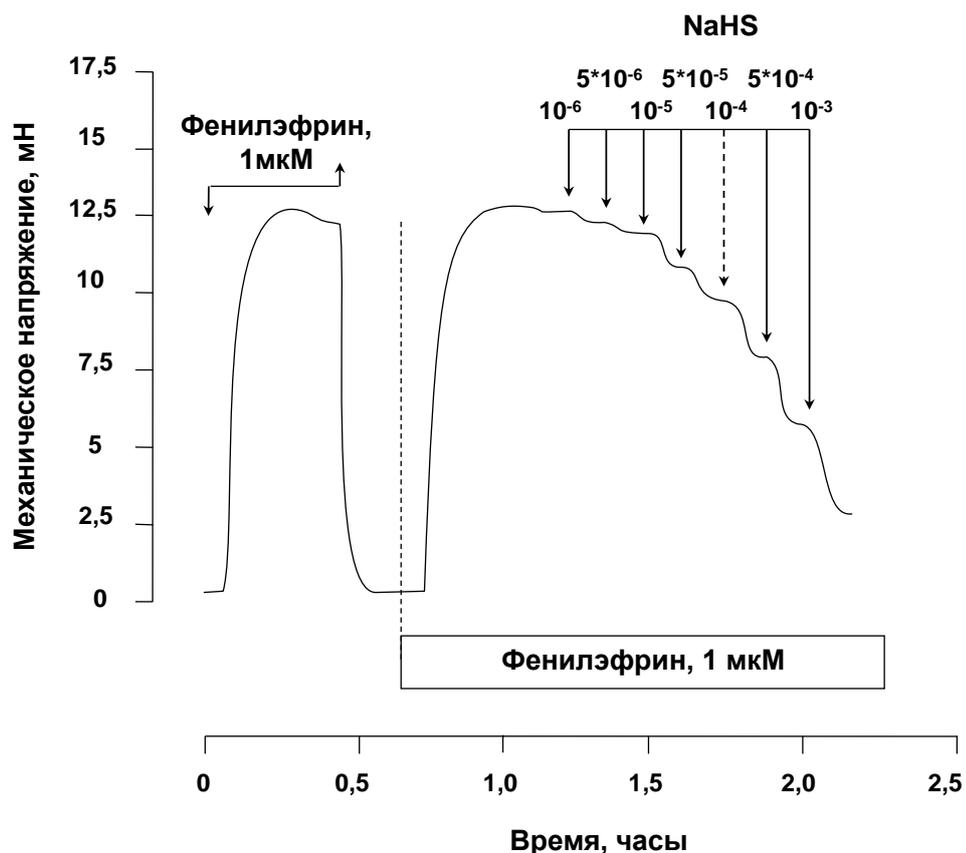
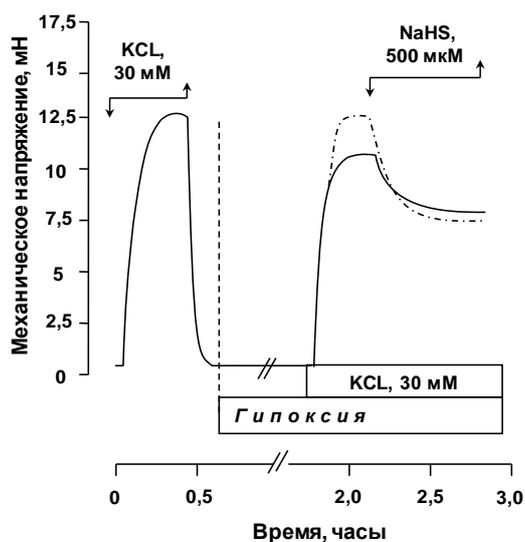


Рисунок 24. Влияние гидросульфида натрия на механическое напряжение гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного 1 мкМ фенилэфрина.

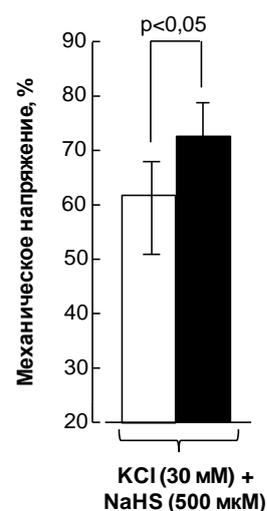
Обозначения: как на рисунке 4. Пунктирной линией показано добавление NaHS в концентрации 100 мкМ.

Хотя релаксирующий эффект, оказываемый 500 мкМ NaHS в условиях гипоксии и реоксигенации, был достоверно ниже аналогичного при нормоксии, но статистически значимо не различался между периодами изменения оксигенации сосудистых гладкомышечных сегментов.

А

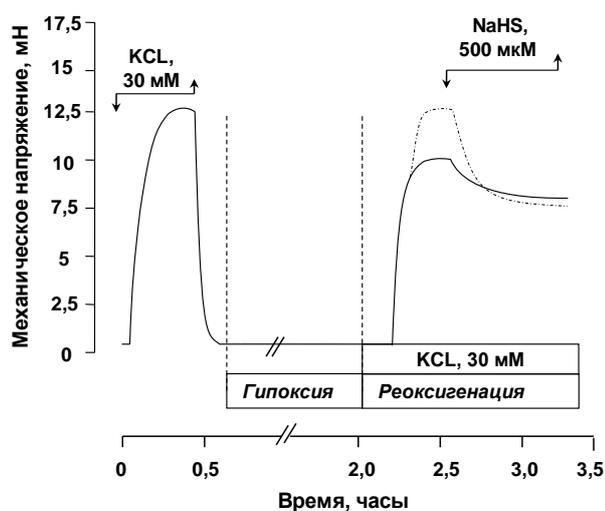


----- Сокращение при действии донора в условиях нормоксии

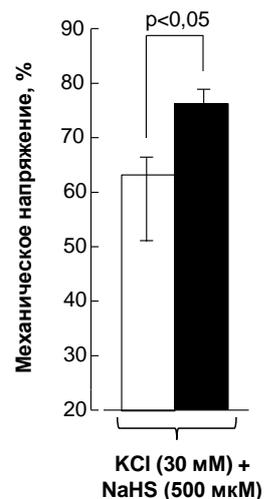


□ - Нормоксия ■ - Гипоксия

Б



----- Сокращение при действии донора в условиях нормоксии



□ - Нормоксия ■ - Реоксигенация

Рисунок 25. Влияние гидросульфида натрия на сократительную реакцию гладких мышц аорты крысы, вызванную гиперкалиевым раствором, в условиях гипоксии (А) и реоксигенации (Б).

Обозначения: как на рисунке 4. $p < 0,05$ – статистически значимые различия.

При добавлении 100 мкМ NaHS на фоне ФЭ-индуцированной сократительной реакции ГМК в условиях гипоксии наблюдалось статистически значимое снижение МН сосудистых сегментов до 68,26 (61,9-69,64)% (n=8, p<0,05) по сравнению с фоновым гипоксическим сокращением (рисунок 26, А). В период же реоксигенации аппликация гидросульфида натрия вызвала увеличение амплитуды сократительного ответа, вызванного действием ФЭ: величина МН сосудистых ГМК составила 118,33 (114,13-121,2)% (n=8, p<0,05) от фонового при данных условиях (рисунок 26, Б).

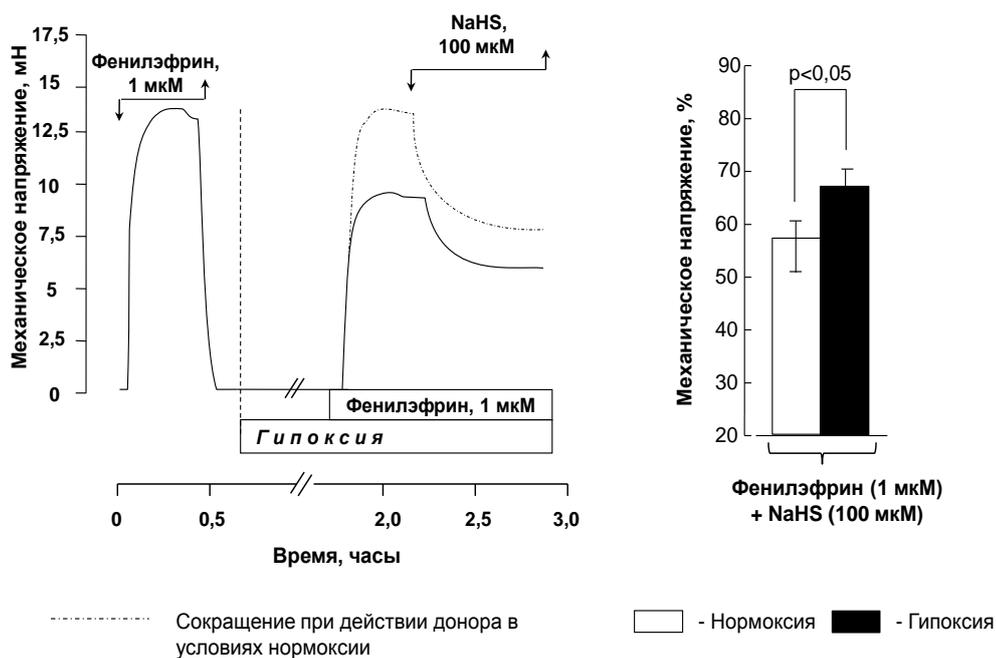
Таким образом, использование в качестве предсокращающего агента агониста α_1 -адренорецепторов фенилэфрина выявило разнонаправленность вазоактивных эффектов H_2S при гипоксии и реоксигенации.

Согласно работам Olson K.R. и соавт. (2006, 2013) внутриклеточное содержание H_2S в гладкомышечных клетках находится в реципрокных редокс-взаимоотношениях с уровнем кислорода, поскольку O_2 принимает непосредственное участие в процессах катаболизма газомедиатора. Так, при дефиците кислорода отмечается угнетение окисления сероводорода, ведущее к увеличению его действующей концентрации и соответствующему функциональному ответу сосудистых ГМК. Причем, авторы в своих исследованиях отмечают во многом схожесть вазоактивного действия гипоксии и сероводорода [115, 167].

Koenitzer J.R. и соавт. (2007), в свою очередь, показали, что при высоком содержании в растворе кислорода и низком – сероводорода происходит окисление последнего, а изменение сократительного ответа ГМК обусловлено уже не самим H_2S , а его окисленными производными, которые, вероятно, также обладают вазоактивным действием [119].

Таким образом, сероводород в качестве модулятора сократительных свойств ГМК, вероятно, вовлекает в свои механизмы действия большее число внутриклеточных сигнальных и эффекторных систем, что и может объяснять его констрикторный эффект на фоне действия ФЭ в условиях гипоксии и реоксигенации.

A



Б

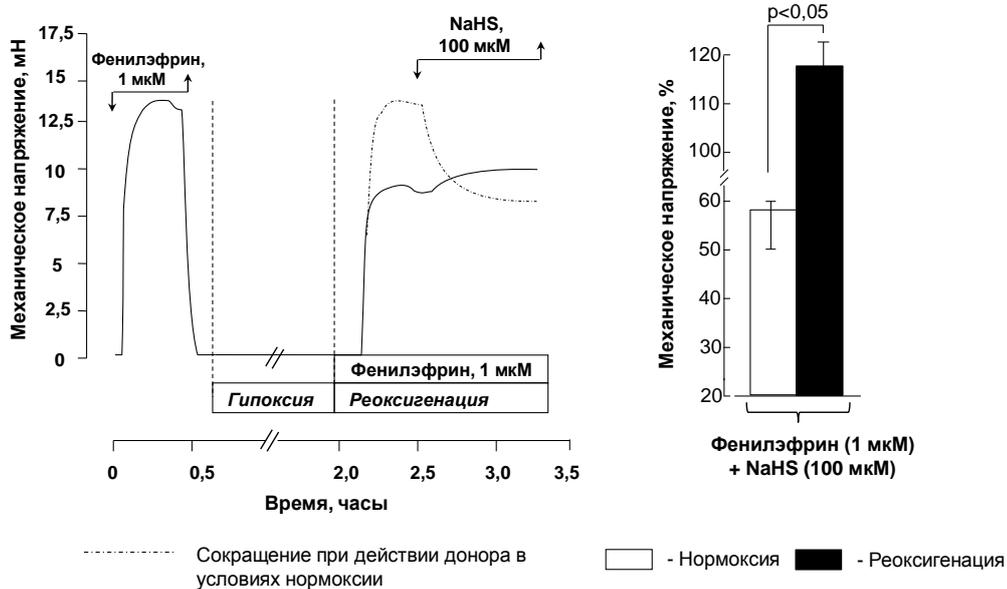


Рисунок 26. Изменение механического напряжения гладкомышечных сегментов аорты крысы, предсокращенных 1 мкМ фенилэфрина, при действии NaHS (100 мкМ) в условиях гипоксии (А) и реоксигенации (Б).

Обозначения: как на рисунке 4. $p < 0,05$ – статистически значимые различия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сдвиги кислородного баланса, возникающие в сосудистых ГМ, при физиологических и патологических воздействиях различного генеза, в том числе, при гипоксии, главным образом, влияют на их сократительную активность.

В проведенном исследовании показано, что в условиях снижения кислорода, равно, как и при реоксигенации, происходило угнетение сократительных реакций ГМК аорты крысы, индуцированных гиперкалиевым раствором или ФЭ. Предполагается, что это может быть опосредовано прямым ингибирующим влиянием изменений кислородного гомеостаза на процессы кальциевого метаболизма в гладких мышцах [90, 121]. Действительно, было установлено, что в условиях гипоксии и реоксигенации сосудистые ГМК, предсокращенные ФЭ, расслаблялись в большей степени, чем при деполяризации гиперкалиевым раствором. Подобные различия можно трактовать с позиции особенностей природы индуцируемых контрактур, сопряженных с различными механизмами входа ионов кальция в ГМК и развития поддерживаемого сокращения. Известно, что при возбуждающем действии агонистов α_1 -адренорецепторов сокращение сосудистых сегментов обеспечивается активацией и устойчивым взаимодействием кальций-кальмодулин-зависимой и С-киназной ветвей кальциевой сигнальной системы [6, 33, 35]. Это позволяет предполагать, что в релаксирующем действии гипоксии и реоксигенации на ФЭ-стимулированные ГМК задействованы два механизма: мембранный и цитоплазматический, причем первый, вероятно, является пусковым фактором.

Снижение величины МН сосудистых сегментов в условиях нарушения их оксигенации может быть также обусловлено изменением пассивного трансмембранного транспорта ионов калия [145, 203, 214]. Применение блокаторов K^+ -каналов - тетраэтиламмония и 4-аминопиридина - позволило установить, что основной вклад в механизмы расслабления ГМ,

предсокращенных гиперкалиевым раствором или ФЭ, при гипоксии/реоксигенации вносят потенциал-зависимый и/или Ca^{2+} -активируемый компоненты калиевой проводимости мембраны ГМК аорты крысы. Роль АТФ-чувствительных K^+ -каналов, рассматриваемых большинством исследователей в качестве основной мишени, задействованной при нарушениях кислородного гомеостаза, была доказана только в случае стимуляции сосудистых сегментов ФЭ. Выявленные особенности, очевидно, связаны с небольшой плотностью данного типа K^+ -каналов в ГМ и степенью их чувствительности к изменению уровня макроэргов в клетках [180].

Наряду с этим, исследования, проведенные на изолированных ГМК, позволяют утверждать, что в условиях гипоксии модулирующее действие на развитие сокращений сосудистых сегментов могут оказывать не только моновалентные ионы калия, но и натрия, причем внутриклеточное содержание последних в условиях недостатка кислорода увеличивается на фоне снижения уровня макроэргов. Таким образом, колебания парциального напряжения кислорода в ГМК, связанные с нарушением их оксигенации, влияют на основные ион-зависимые эффекторные системы, отражая в итоге, вмешательство в механизмы внутриклеточной трансдукции сигналов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях гипоксии и реоксигенации газотрансмиттеры – монооксид углерода (СО) и сероводород (H_2S) – по-разному проявляют свое действие на МН сосудистых гладкомышечных сегментов. Так, вазорелаксирующий эффект СО при нарушении оксигенации ГМК снижался в зависимости от типа предсокращающего агента. Предположительно, это может быть обусловлено общностью мембранных и молекулярных систем, ответственных за индукцию и реализацию газовых сигналов в ГМ, что также подтверждается более выраженным угнетением амплитуды агонист-стимулированных сокращений сосудистых сегментов.

Вазоактивные эффекты H_2S , как показано, зависели не только от особенностей фактора, вызвавшего сократительный ответ ГМК, но и условий, в которых он развивался. При гипоксии и реоксигенации H_2S снижал МН сосудистых сегментов, индуцированных гиперкалиевым раствором, но по-разному влиял на сокращения ГМ, вызванные ФЭ: расслаблял при гипоксии и потенцировал при реоксигенации. Вероятно, миогенные эффекты H_2S связаны с вовлечением в его механизмы действия дополнительных внутриклеточных сигнальных путей, в частности, цАМФ-зависимой сигнальной системы [114, 115, 150].

Таким образом, фундаментальные проблемы физиологии, связанные с механизмами регуляции сократительной активности ГМК газовыми посредниками, требуют дополнительных исследований и при нарушении кислородного гомеостаза. Это позволит в последующем приблизиться к разработке лекарственных препаратов на их основе, и повысить эффективность терапии гипоксических состояний и связанных с ними последствий.

ВЫВОДЫ

1. Сократительные ответы гладкомышечных клеток аорты крысы, индуцированные действием гиперкалиевого раствора или фенилэфрином, снижаются в условиях гипоксии и реоксигенации, при этом в большей степени подавляются ответы, вызванные активацией α_1 -адренергических рецепторов.

2. Угнетающее влияние гипоксии и реоксигенации на сокращение сосудистых гладких мышц обусловлены активацией потенциал- и/или Ca^{2+} -зависимого компонента калиевой проводимости мембраны клеток, а на фоне действия фенилэфрина – дополнительным повышением проводимости АТФ-чувствительных калиевых каналов.

3. Гипоксия и ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы убаином приводят к снижению внутриклеточного содержания АТФ и возникновению дисбаланса моновалентных катионов в гладкомышечных клетках: увеличению внутриклеточной концентрации натрия и снижению – калия.

4. Монооксид углерода при гипоксии и реоксигенации оказывает релаксирующее действие на предсокращенные гиперкалиевым раствором или фенилэфрином гладкомышечные клетки аорты крысы.

5. Сероводород в условиях гипоксии и реоксигенации снижает величину сократительных ответов сосудистых гладкомышечных клеток, индуцированных гиперкалиевым раствором, но разнонаправлено модулирует сократительные реакции гладких мышц, вызванные α_1 -адреномиметиком фенилэфрином.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баскаков, М.Б. Газовая атака, или Осторожно, газы! / М.Б. Баскаков, М.С. Юсубов // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 6. – С. 160–164.
2. Биленко, М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения) / М.В. Биленко. – М: Медицина, 1989. – 368 с.
3. Вараксин, А.А. Сероводород как регулятор системных функций у позвоночных / А.А. Вараксин, Е.В. Пушина // Нейрофизиология. – 2011. – Т. 43, № 1. – С. 73–84.
4. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский общеобразовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13–19.
5. Влияние сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы / М.Б. Баскаков, С.В. Гусакова, А.С. Желудева и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 6. – С. 12–17.
6. Внутриклеточные сигнальные системы в эпителий- и эндотелийзависимых процессах расслабления гладких мышц / Л.В. Капилевич, И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков, М.А. Медведев // Успехи физиологических наук. – 2001. – Т. 32, № 2. – С. 88-98.
7. Воротников, А.В. Внутриклеточная сигнализация и фосфорилирование белков при сокращении гладких мышц / А.В. Воротников, М.А. Крымский, В.П. Ширинский // Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 12. – С. 1587–1610.
8. Газовая сигнализация в клетках млекопитающих / С.В. Гусакова, И.В. Ковалев, Л.В. Смаглий и др. // Успехи физиологических наук. – 2015. – Т. 46, № 4. – С. 53–73.
9. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / пер с англ. – М: Практика, 1999. – 459 с.

10. Гривенникова, В.Г. Генерация активных форм кислорода митохондриями / В.Г. Гривенникова, А.Д. Виноградов // Успехи биологической химии. – 2013. – Т. 53. – С. 245–296.
11. Гусакова, С.В. АФК-зависимые механизмы регуляции вторичными посредниками электрической и сократительной активности гладких мышц: дис. ... д-ра мед. наук / С.В. Гусакова. – Томск, 2011. – 247 с.
12. Гусев, Н.Б. Молекулярные механизмы мышечного сокращения / Н.Б. Гусев // Соросовский общобразовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 8. – С. 24–32.
13. Дас, Д.К. Превращение сигнала гибели в сигнал выживания при редокс-сигналикации. Обзор / Д.К. Дас, Н. Молик // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 1. – С. 16–24.
14. Дерябина, Ю.И. Ca^{2+} -транспортирующие системы митохондрий: свойства, регуляция, таксономические особенности. Обзор / Ю.И. Дерябина, Е.П. Исакова, Р.А. Звягильская // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 1. – С. 114–127.
15. Желудева, А.С. Ионные механизмы действия монооксида углерода на сократительную активность сосудистых гладких мышц / А.С. Желудева // Современные проблемы науки и образования: электронный научный журнал. – 2013. – № 2. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=8689> (дата обращения: 14.09.2014).
16. Зенков, Н.К. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова – М: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. – 343 с.
17. Зефирова, А.Л. Ионные каналы возбудимой клетки (структура, функция, патология) / А.Л. Зефирова, Г.Ф. Ситдикова. – Казань: Арт-кафе, 2010. – 271 с.
18. Калиман, П.А. Гемоксигеназная активность в тканях сосудов и сердца крыс при совместном введении ингибитора NO-синтазы и хлорида

гемина / П.А. Калиман, В.П. Филимоненко, И.В. Никитченко // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 2. – С. 128–134.

19. Камкин, А.Г. Физиология и молекулярная биология мембран клеток: учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А.Г. Камкин, И.С. Киселева. – М: Издательский центр «Академия», 2008. – 592 с.

20. Кленова, Н.А. Биохимия патологических состояний: учебное пособие / Н.А. Кленова. – Самара: Изд-во «Самарский университет», 2006 – 216 с.

21. Колесников, С.И. Сероводород как третья эссенциальная газовая молекула живых тканей / С.И. Колесников, Б.Я. Власов, Л.И. Колесникова // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. – Т. 70, № 2. – С. 237–241. doi:10.15690/vramn.v70i2.1318

22. Коржов, В.И. Монооксид углерода / В.И. Коржов, А.В. Видмаченко, М.В. Коржов // Журн. АМН України. – 2010. - Т. 16, № 1. – С. 23–37.

23. Кремер, Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика / Н.Ш. Кремер. – М.: ЮНИТИ-ДАНА, 2004. – 573 с.

24. Крутецкая, З.И. Структурно-функциональная организация сигнальных систем в клетках / З.И. Крутецкая, О.Е. Лебедев // Цитология. – 2000. – Т. 42, № 9. – С. 844–874.

25. Лисенков, А.Н. Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов / А.Н. Лисенков. – М: Медицина, 1979. – 344 с.

26. Лукьянова, Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции / Л.Д. Лукьянова // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1997. – Т. 124, № 9. – С. 244–254.

27. Лукьянова, Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2011. – № 1. – С. 3–19.

28. Лукьянова, Л.Д. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова, Ю.И. Кирова, Г.В. Сукоян // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29, № 4. – С. 238–252.
29. Макаренко, А.Н. Адаптация к гипоксии как защитный механизм при патологических состояниях / А.Н. Макаренко, Ю.К. Карандеева // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Т. 2, № 100. – С. 27–32.
30. Маслов, Л.Н. Кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования на модели изолированного сердца / Л.Н. Маслов, А.С. Горбунов, Ю.Б. Лишманов // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2012. – Т. 153, № 3. – С. 290–291.
31. Мельников, К.Н. Кальциевые каналы возбудимых мембран / К.Н. Мельников // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2007. – Т. 5, № 1. – С. 28–42.
32. Меньщикова, Е.Б. Механизмы развития окислительного стресса при ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, А.Ф. Сафина // Успехи современной биологии. – 1997. – Т. 117, № 3. – С. 362–373.
33. Механизмы регуляции функций гладких мышц вторичными посредниками / М.Б. Баскаков, М.А. Медведев, И.В. Ковалев и др. – Томск: Гавань, 1996. – 154 с.
34. Механизмы участия митохондрий в развитии патологических процессов, сопровождающихся ишемией и реперфузией / Н.П. Судаков, С.Б. Никифоров, Ю.М. Константинов и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – № 5(51). – С. 332–336.
35. Миогенные эффекты циклического гуанозинмонофосфата в гладкомышечных клетках. Роль протеинкиназы С / И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков, М.А. Медведев и др. / Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2003. – Т. 89, № 4. – С. 436–446.

36. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. — 544 с.
37. Натрий-калий-хлор-котранспорт в регуляции миогенного тонуса сосудов / С.Н. Орлов, С.В. Кольцова, Я.Д. Анфиногенова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 6. – С. 165–173.
38. Некоторые механизмы нарушения биоэнергетики и оптимизация подходов к их фармакотерапии / В.А. Кашуро, В.Б. Долго-Сабуров, В.А. Башарин и др. // Биомедицинский журнал: Medline.ru. – 2010. – № 11. – Режим доступа: <http://www.medline.ru/public/art/tom11/art52.html> (дата обращения: 14.11.2013).
39. Новиков, В.Е. Фармакология и биохимия гипоксии / В.Е. Новиков, Н.П. Катунина // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2002. – Т. 1, № 2. – С. 73–87.
40. Осипов, О.А. Активные формы кислорода и их роль в организме / О.А. Осипов, Ю.А. Азизова, Ю.А. Владимиров // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 31. – С. 180–203.
41. Патолофизиология: учебник в 2-х томах / под ред.: В.В. Новицкого, Е.Д. Гольдберга, О.И. Уразовой. – 4-е изд., перераб. и доп. – М: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – Т. 1. – 848 с.
42. Пероксид водорода как новый вторичный посредник / В.А. Ткачук, П.А. Тюрин-Кузьмин, В.В. Белоусов, А.В. Воротников // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29, № 1–2. – С. 21–37.
43. Сероводород в регуляции сократимости миокарда лягушки / Н.Н. Хаертдинов, Д.Р. Ахметшина, А.Л. Зефилов, Г.Ф. Ситдикова // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29, № 4. – С. 231–237.
44. Сидоров, А.В. Физиология межклеточной коммуникации: учебное пособие / А.В. Сидоров. – Минск: БГУ, 2008. – 215 с.
45. Ситдикова, Г.Ф. Газомедиаторы: от токсических эффектов к регуляции клеточных функций и использованию в клинике / Г.Ф. Ситдикова,

А.В. Яковлев, А.Л. Зефирова // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 6. – С. 185–200.

46. Ситдикова, Г.Ф. Сероводород: от канализаций Парижа к сигнальной молекуле / Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефирова // Природа. – 2010. – № 9. – С. 29–37.

47. Тугай, В.А. Механизмы поступления Ca^{2+} в цитоплазму мышечных клеток. Роль протонов и активных метаболитов азота (кислорода) в этих процессах / В.А. Тугай, Ю.В. Данилович // Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 78, № 2. – С. 37–51.

48. Улащик, В.С. Современные представления и биологической роли эндогенного сероводорода / В.С. Улащик // Здоровоохранение. – 2012. – № 1. – С. 42–48.

49. Чеснокова, Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы цитотоксического действия гипоксии. Патогенез гипоксического некробиоза / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Современные наукоемкие технологии: научный журнал. – 2006. – № 7. – Режим доступа: <http://www.top-technologies.ru/ru/article/view?id=22988> (дата обращения: 10.12.2013).

50. Ширинский, В.П. Клеточная подвижность в сердечно-сосудистой системе / В.П. Ширинский, А.В. Воротников // Природа. – 2005. – № 12. – С. 39–44.

51. 4-aminopyridine-sensitive K^+ channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery / W.S. Cheang, W.T. Wong, B. Shen et al. // Vascul. Pharmacol. – 2010. – Vol. 53(3-4). – P. 94–98. doi: 10.1016/j.vph.2010.04.004

52. Abraham, N.G. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase / N.G. Abraham, A. Kappas // Pharmacol. Rev. – 2008. – Vol. 60(1). – P. 79–127. doi: 10.1124/pr.107.07104

53. Activity of Ca^{2+} -activated Cl^- -channels contributes to regulating receptor- and store-operated Ca^{2+} entry in human pulmonary artery smooth muscle

cells / A. Yamamura, H. Yamamura, A. Zeifman, J.X. Yuan // *Pulm. Circ.* – 2011. – Vol. 1(2). – P. 269–279. doi: 10.4103/2045-8932.83447

54. Acute hypoxia activates store-operated Ca(2+) entry and increases intracellular Ca(2+) concentration in rat distal pulmonary venous smooth muscle cells / G. Peng, P. Ran, W. Lu et al. // *J. Thorac. Dis.* – 2013. – Vol. 5(5). – P. 605–612. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.68

55. Acute Oxygen-Sensing Mechanisms [Electronic resource] / E.K. Weir, J. López-Barneo, K.J. Buckler, S.L. Archer // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 353(19). – URL: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra050002> (дата обращения: 23.03.2014). doi: 10.1056/NEJMra050002

56. Adenosine and hypoxic dilation of rat coronary small arteries: roles of the ATP-sensitive potassium channel, endothelium, and nitric oxide / F.M. Lynch, C. Austin, A.M. Heagerty, A.S. Izzard // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2006. – Vol. 290, N 3. – P. H1145–H1150.

57. Araujo, J.A. Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis [Electronic resource] / J.A. Araujo, M. Zhang, F. Yin // *Front. Pharmacol.* – 2012. – URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389> (дата обращения: 16.11.2015). doi: 10.3389/fphar.2012.00119

58. Baker, E.H. Ion channels and the control of blood pressure / E.H. Baker // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 49(3). – P. 185–198. doi: 10.1046/j.1365-2125.2000.00159.x

59. Barman, S.A. RhoA/Rho-kinase signaling: therapeutic target in pulmonary hypertension / S.A. Barman, S. Zhu, R.E. White // *Vasc. Health Risk. Manag.* – 2009. – Vol. 5. – P. 663–671.

60. Benoit, J.N. Vascular reactivity following ischemia/reperfusion / J.N. Benoit, M.S. Taylor // *Front. Biosci.* – 1997. – Vol. 2. – P. e28–e33.

61. Bracken, C.P. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses / C.P. Bracken, M.L. Whitelaw, D.J. Peet // *Cell Mol. Life Sci.* – 2003. – Vol. 60(7). – P. 1376–1393.

62. Brandes, R.P. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation / R.P. Brandes, N. Weissmann, K. Schröder // *Free Radic. Biol. Med.* – 2014. – Vol. 76. – P. 208–226. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046
63. Bright, R. The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury / R. Bright, D. Mochly-Rosen // *Stroke* – 2005. – Vol. 36(12). – P. 2781–2790.
64. Brown, D.I. Regulation of Signal Transduction by Reactive Oxygen Species in the Cardiovascular System / D.I. Brown, K.K. Griendling // *Circ. Res.* – 2015. – Vol. 116(3). – P. 531–549.
65. Bulley, S. Cl^- channels in smooth muscle cells / S. Bulley, J.H. Jaggar // *Pflugers Arch.* – 2014. – Vol. 466(5). – P. 861–872. doi: 10.1007/s00424-013-1357-2
66. Ca^{2+} -desensitizing hypoxic vasorelaxation: pivotal role for the myosin binding subunit of myosin phosphatase (MYPT1) in porcine coronary artery / R.L. Wardle, M. Gu, Y. Ishida, R.J. Paul // *J. Physiol.* – 2006. – Vol. 572(1). – P. 259–267. doi: 10.1113/jphysiol.2005.104083
67. Ca^{2+} -independent hypoxic vasorelaxation in porcine coronary artery / M. Gu, G.D. Thorne, R.L. Wardle et al. // *J. Physiol.* – 2005. – Vol. 562(3). – P. 839–846.
68. Calvert, J.W. Novel Insights Into Hydrogen Sulfide-Mediated Cytoprotection / J.W. Calvert, W.A. Coetzee, D.J. Lefer // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – Vol. 12, N. 10. – P. 1203–1217. doi:10.1089/ars.2009.2882
69. Carbon monoxide – physiology, detection and controlled release / S.H. Heinemann, T. Hoshi, M. Westerhausen, A. Schiller // *Chem. Commun.* – 2014. – Vol. 50. – P. 3644–3660.
70. Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells / T. Morita, S.A. Mitsialis, H. Koike et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, N 52. – P. 32804–32809.
71. Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca^{2+} sparks to Ca^{2+} -activated K^+ channels / J.H. Jaggar, C.W. Leffler, S.Y.

Cheranov et al. // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 91(7). – P. 610–617. doi: 10.1161/01.RES.0000036900.76780.95

72. Carbon Monoxide inhibits L-type Ca^{2+} channels via redox modulation of key cysteine residues by mitochondrial reactive oxygen species / J.L. Scragg, M.L. Dallas, J.A. Wilkinson et al. // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283(36). – P. 24412–24419. doi: 10.1074/jbc.M803037200

73. Carbon monoxide protects against oxidant-induced apoptosis via inhibition of Kv2.1 / M.L. Dallas, J.P. Boyle, C.J. Milligan et al. // *FASEB J.* – 2011. – Vol. 25. – P. 1519–1530.

74. Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities // R. Motterlini, J.E. Clark, R. Foresti et al. // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 90(2). – P. E17–E24.

75. Cellular mechanism of oxygen sensing / J. Lopez-Barneo, R. Pardal, P. Ortega-Sáenz // *Annu. Rev. Physiol.* – 2001. – Vol. 63. – P. 259–287. doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.259

76. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransport, intracellular Cl^- and L-type Ca^{2+} channels / Y.J. Anfinogenova, M.B. Baskakov, I.V. Kovalev et al. // *Pflugers Arch.* – 2004. – Vol. 449(1). – P. 42–55.

77. Chan, C.K. Hypoxia, vascular smooth muscles and endothelium / C.K. Chan, P.M. Vanhoutte // *Acta Pharmacol. Sin. B.* – 2013. – Vol. 3(1). – P. 1–7. doi:10.1016/j.apsb.2012.12.007

78. Chen, C.Q. Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential / C.Q. Chen, H. Xin, Y.Z. Zhu // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2007. – Vol. 28(11). – P. 1709–1716.

79. Cheranov, S.Y. Sarcoplasmic reticulum calcium load regulates rat arterial smooth muscle calcium sparks and transient K_{Ca} currents / S.Y. Cheranov, J.H. Jaggar // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 544, N 1. – P. 71–84. doi: 10.1113/jphysiol.2002.025197

80. Close, L.A. Reoxygenation-induced relaxation of coronary arteries. A novel endothelium-dependent mechanism / L.A. Close, P.S. Bowman, R.J. Paul // *Circ. Res.* – 1994. – Vol. 74(5). – P. 870–881. doi: 10.1161/01.RES.74.5.870
81. Cohen, K.D. Hypoxia inhibits contraction but not calcium channel currents or changes in intracellular calcium in arteriolar muscle cells / K.D. Cohen, W.F. Jackson // *Microcirculation.* – 2003. – Vol. 10(2). – P. 133–141. doi: 10.1038/sj/mn.7800178
82. Comprehensive review on lactate metabolism in human health / M. Adeva-Andany, M. López-Ojén, R. Funcasta-Calderón et al. // *Mitochondrion.* – 2014. – Vol. 17. – P. 76–100. doi: 10.1016/j.mito.2014.05.007
83. Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery / G.D. Webb, L.H. Lim, V.M. Oh et al. // *JPET.* – 2008. – Vol. 324(2). – P. 876–882.
84. Cross-talk between Rho-associated kinase and cyclic nucleotide-dependent kinase signaling pathways in the regulation of smooth muscle myosin light chain phosphatase / M.E. Grassie, C. Sutherland, A. Ulke-Lemée et al. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287(43). – P. 36356–36369. doi: 10.1074/jbc.M112.398479
85. Cysteine residue 911 in C-terminal tail of human BK(Ca) α channel subunit is crucial for its activation by carbon monoxide / V. Telezhkin, S.P. Brazier, R. Mears et al. // *Pflügers Arch.* – 2011. – Vol. 461. – P. 665–675.
86. Different mechanisms underlying the stimulation of K_{Ca} channels by nitric oxide and carbon monoxide / L. Wu, K. Cao, Y. Lu, R. Wang // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110(5). – P. 691–700. doi: 10.1172/JCI15316
87. Differential Effects of Cystathionine- γ -lyase-Dependent Vasodilatory H₂S in Periadventitial Vasoregulation of Rat and Mouse Aortas [Electronic resource] / C. Köhn, J. Schleifenbaum, Is.A. Szijártó et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(8). – URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/0041951> (дата обращения: 02.10.2014). doi: 10.1371/journal.pone.0041951

88. Dual pathways of carbon monoxide-mediated vasoregulation: modulation by redox mechanisms / B.D. Lamon, F.F. Zhang, N. Puri et al. // *Circ. Res.* – 2009. – Vol. 105(8). – P. 775–783. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.197434
89. Effect of hypoxia and endothelial loss on vascular smooth muscle cell responsiveness to VEGF-A: role of flt-1/VEGF-receptor-1 / A. Parenti, L. Brogelli, S. Filippi et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – Vol. 55(1). – P. 201–212.
90. Effects of hypoxia on isometric force, intracellular Ca^{2+} , pH, and energetics in porcine coronary artery / Sh. Shimizu, P.S. Bowman, G. Thorne III, R.J. Paul // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 86. – P. 862–870. doi: 10.1161/01.RES.86.8.862
91. Effects of hypoxia, anoxia, and metabolic inhibitors on KATP channels in rat femoral artery myocytes / J.M. Quayle, M.R. Turner, H.E. Burrell, T. Kamishima // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – Vol. 291, N 1. – P. H71–H80. doi: 10.1152/ajpheart.01107.2005
92. Effects of oxygen tension on energetics of cultured vascular smooth muscle / A. Lindqvist, K. Dreja, K. Sward, P. Hellstrand // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – Vol. 283. – P. H110–H117. doi: 10.1152/ajpheart.00040.2001
93. Electrophysiological effects of hydrogen sulfide on guinea pig papillary muscles in vitro / M. Xu, Y.M. Wu, Q. Li et al. // *Acta Physiologica Sinica.* – 2007. – Vol. 59(2). – P. 215–220.
94. Emerging role of gasotransmitters in renal transplantation / P.M. Snijder, E. van den Berg, M. Whiteman et al. // *Am. J. Transplant.* – 2013. – Vol. 13(12). – P. 3067–3075. doi: 10.1111/ajt.12483
95. Exogenous hydrogen sulfide inhibits superoxide formation, NOX-1 expression and Rac1 activity in human vascular smooth muscle cells / S. Muzaffar, N. Shukla, M. Bond et al. // *J. Vasc. Res.* – 2008. – Vol. 45(6). – P. 521–528. doi: 10.1159/000129686

96. Föhling, M. Cellular oxygen sensing, signalling and how to survive translational arrest in hypoxia / M. Föhling // *Acta Physiol. (Oxf)*. – 2009. – Vol. 195(2). – P. 205–230. doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01894.x
97. Fandrey, J. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation / J. Fandrey, T.A. Gorr, M. Gassmann // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – Vol. 71(4). – P. 642–651. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.05.005
98. Franco-Obregón, A. Oxygen-sensitive calcium channels in vascular smooth muscle and their possible role in hypoxic arterial relaxation / A. Franco-Obregón, J. Ureña, J. López-Barneo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1995. – Vol. 92(10). – P. 4715–4719.
99. Gauthier, K.M. Hypoxia-induced vascular smooth muscle relaxation: increased ATP-sensitive K⁺ efflux or decreased voltage-sensitive Ca²⁺ influx? / K.M. Gauthier // *Am. J. Physiol.* – 2006. – Vol. 291, N 1. – P. H24–H25. doi: 10.1152/ajpheart.00260.2006
100. Gupte, S.A. Hypoxia promotes relaxation of bovine coronary arteries through lowering cytosolic NADPH / S.A. Gupte, M.S. Wolin // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – Vol. 290. – P. H2228–H2238.
101. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase / G. Yang, L. Wu, B. Jiang et al. // *Science*. – 2008. – Vol. 322(5901). – P. 587–590. doi: 10.1126/science.1162667
102. H₂S Signals Through Protein S-Sulfhydration / A.K. Mustafa, M.M. Gadalla, N. Sen et al. // *Sci. Signal*. – 2009. – Vol. 2, N 96. – P. ra72.
103. Halestrap, A.P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die / A.P. Halestrap // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – Vol. 34. – P. 232–237.
104. Hamanaka, R.B. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling / R.B. Hamanaka, N.S. Chandel // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 21(6). – P. 894–899. doi: 10.1016/j.ceb.2009.08.005

105. Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels / J.H. Jaggar, A. Li, H. Parfenova et al. // *Circ. Res.* – 2005. – Vol. 97(8). – P. 805–812.

106. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling / M. Bilban, A. Haschemi, B. Wegiel et al. // *J. Mol. Med. (Berl.)*. – 2008. – Vol. 86(3). – P. 267–279.

107. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities / Y.M. Kim, H.O. Pae, J.E. Park et al. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2011. – Vol. 14(1). – P. 137–167. doi: 10.1089/ars.2010.3153

108. Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in Vascular Pathobiology. Focus on Angiogenesis / J. Dulak, J. Deshane, A. Jozkowicz, A. Agarwal // *Circulation*. – 2008. – Vol. 117(2). – P. 231–241.

109. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth / K.J. Peyton, S.V. Reyna, G.B. Chapman et al. // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – P. 4443–4448. doi:10.1182/blood.V99.12.4443

110. Herrera, G.M. Involvement of L-type calcium channels in hypoxic relaxation of vascular smooth muscle / G.M. Herrera, B.R. Walker // *J. Vasc. Res.* – 1998. – Vol. 35(4). – P. 265–273.

111. HIF-prolyl hydroxylases and cardiovascular diseases / S.S. Banerjee, M. Iirunavukkarasu, M.T. Rishi et al. // *Toxicol. Mechan. Methods*. – 2012. – Vol. 22, N 5. – P. 347–358. doi: 10.3109/15376516.2012.673088

112. Huang, S. A cardioprotective insight of the cystathionine γ -lyase/hydrogen sulfide pathway / S. Huang, H. Li, J. Ge // *IJC Heart & Vasculature*. – 2015. – Vol. 7. – P. 51–57. doi:10.1016/j.ijcha.2015.01.010

113. Hydrogen sulfide activates Ca^{2+} sparks to induce cerebral arteriole dilatation / G.H. Liang, Qi Xi, Ch.W. Leffler, J.H. Jaggar // *J. Physiol.* – 2012. – Vol. 590, N 11. – P. 2709–2720. doi: 10.1113/jphysiol.2011.225128

114. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction [Electronic resource] / W. Guo, J.T. Kan, Z.Y. Cheng et

al. // Oxid. Med. Cell. Long. – 2012. – URL:
<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2012/878052> (дата обращения:
07.10.2015). doi: 10.1155/2012/878052

115. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor/transducer in vertebrate hypoxic vasoconstriction and hypoxic vasodilation / K.R. Olson, R.A. Dombkowski, M.J. Russell et al. // J. Exp. Biol. – 2006. – Vol. 209(20). – P. 4011–4023. doi: 10.1242/jeb.02480

116. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling / S. Jha, J.W. Calvert, M.R. Duranski et al. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2008. – Vol. 295, N 2. – P. H801–H806. doi: 10.1152/ajpheart.00377.2008

117. Hydrogen sulfide dilates cerebral arterioles by activating smooth muscle cell plasma membrane KATP channels / G.H. Liang, A. Adebisi, M.D. Leo et al. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2011. – Vol. 300, N 6. – P. H2088–H2095. doi: 10.1152/ajpheart.01290.2010

118. Hydrogen sulfide mediates hypoxia-induced relaxation of trout urinary bladder smooth muscle / R.A. Dombkowski, M.M. Doellman, S.K. Head, K.R. Olson // J. Exp. Biol. – 2006. – Vol. 209(16). – P. 3234–3240. doi: 10.1242/jeb.02376

119. Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O₂-dependent manner / J.R. Koenitzer, T.S. Isbell, H.D. Patel et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2007. – Vol. 292, N 4. – P. H1953–H1960.

120. Hydrogen sulphide induced-dual vascular effect involves arachidonic acid cascade in rat mesenteric arterial bed / R. Di Villa Bianca, R. Sorrentino, C. Coletta et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2011. – Vol. 337(1). – P. 59–64.

121. Hypoxia inhibits vasoconstriction induced by metabotropic Ca²⁺ channel-induced Ca²⁺ release in mammalian coronary arteries / E. Calderón-Sánchez, M. Fernández-Tenorio, A. Ordóñez et al. // Cardiovasc. Res. – 2009. – Vol. 82(1). – P. 115–124. doi: 10.1093/cvr/cvp006

122. Hypoxia leads to Na,K-ATPase downregulation via Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels and AMPK activation / G.A. Gusarova, H.E. Trejo, L.A. Dada et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2011. – Vol. 31(17). – P. 3546–3556. doi: 10.1128/MCB.05114-11

123. Hypoxia reduces K_{Ca} channel activity by inducing Ca²⁺ spark uncoupling in cerebral artery smooth muscle cells / G. Zhao, A. Adebisi, Q. Xi, J.H. Jaggar // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 292, N 6. – P. C2122–C2128. doi: 10.1152/ajpcell.00629.2006

124. Hypoxia selectively inhibits KCNA5 channels in pulmonary artery smooth muscle cells / A.L. Firth, O. Platoshyn, E.E. Brevnova et al. // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 1177. – P. 101–111. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05040.x

125. Hypoxia sensitivity of a voltage-gated potassium current in porcine intrapulmonary vein smooth muscle cells / C. Dospinescu, H. Widmer, I. Rowe et al. // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2012. – Vol. 303, N 5. – P. L476–L486. doi: 10.1152/ajplung.00157.2012

126. Hypoxia-mediated degradation of Na,K-ATPase via mitochondrial reactive oxygen species and the ubiquitin-conjugating system / A.P. Comellas, L.A. Dada, E. Lecuona et al. // *Circ. Res.* – 2006. – Vol. 98(10). – P. 1314–1322. doi: 10.1161/01.RES.0000222418.999976.1d

127. Hypoxic pulmonary vasoconstriction / J.T. Sylvester, L.A. Shimoda, P.I. Aaronson, J.P. Ward // *Physiol. Rev.* – 2012. – Vol. 92, N 1. – P. 367–520. doi: 10.1152/physrev.00041.2010

128. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies / Ph.I. Aaronson, T.P. Robertson, Gr.A. Knock et al. // *J. Physiol.* – 2006. – Vol. 570(1). – P. 53–58. doi: 10.1113/jphysiol.2005.098855

129. Impact of l-arginine on hydrogen sulfide/cystathionine- γ -lyase pathway in rats with high blood flow-induced pulmonary hypertension / W. Yanfei, S. Lin, D. Junbao, T. Chaoshu // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 2006. – Vol. 345(2). – P. 851–857.

130. Inhibition of ROS-activated p38MAPK pathway is involved in the protective effect of H₂S against chemical hypoxia-induced inflammation in PC12 cells / A. Lan, W. Xu, H. Zhang et al. // *Neurochem. Res.* – 2013. – Vol. 38(7). – P. 1454–1466. doi: 10.1007/s11064-013-1044-x

131. Intermittent hypoxia in rats increases myogenic tone through loss of hydrogen sulfide activation of large-conductance Ca(2+)-activated potassium channels / O. Jackson-Weaver, D.A. Paredes, L.V. Gonzalez et al. // *Circ Res.* – 2011. – Vol. 108(12). – P. 1439–1447. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.228999

132. Jackson, W.F. Hypoxia Does Not Activate ATP-Sensitive K⁺ Channels in Arteriolar Muscle Cells / W.F. Jackson // *Microcirculation.* – 2000. – Vol. 7(2). – P. 137–145.

133. Jernigan, N.L. Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia / N.L. Jernigan, B.R. Walker, T.C. Resta // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2008. – Vol. 295, N 3. – P. L515–L529. doi: 10.1152/ajplung.00355.2007

134. K⁺ and Ca²⁺ channel activity and cytosolic [Ca²⁺] in oxygen-sensing tissues / J. López-Barneo, R. Pardal, R.J. Montoro et al. // *Resp. Physiol.* – 1999. – Vol. 115, N 2. – P. 215–227.

135. Kashfi, Kh. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras / Kh. Kashfi, K.R. Olson // *Biochem. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 85(5). – P. 689–703. doi:10.1016/j.bcp.2012.10.019

136. Khan, A.A. Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases / A.A. Khan, J.G. Quigley // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1813(5). – P. 668–682. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.008

137. Kinase-dependent activation of voltage-gated Ca²⁺ channels by ET-1 in pulmonary arterial myocytes during chronic hypoxia / T. Luke, J. Maylor, Cl. Udem et al. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2012. – Vol. 302. – P. L1128–L1139. doi:10.1152/ajplung.00396.2011

138. Klimova, T. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF / T. Klimova, N.S. Chandel // *Cell Death Differ.* – 2008. – Vol. 15(4). – P. 660-666. doi: 10.1038/sj.cdd.4402307
139. Knock, G.A. Redox regulation of protein kinases as a modulator of vascular function / G.A. Knock, J.P. Ward // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – Vol. 15, N 6. – P. 1531–1547. doi: 10.1089/ars.2010.3614
140. Kourembanas, S. Hypoxia and carbon monoxide in the vasculature / S. Kourembanas // *Antioxid. Redox Signal.* – 2002. – Vol. 4, N 2. – P. 291–299.
141. $K_{v2.1}$ channels mediate hypoxic inhibition of I_{KV} in native pulmonary arterial smooth muscle cells of the rat / D.S. Hogg, A.R. Davies, G. McMurray, R.Z. Kozlowski // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – Vol. 55(2). – P. 349–360. doi: 10.1016/S0008-6363(02)00411-X
142. K_{v7} channels are involved in hypoxia-induced vasodilatation of porcine coronary arteries / E.R. Hedegaard, B.D. Nielsen, A. Kun et al. // *Br. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 171(1). – P. 69–82. doi: 10.1111/bph.12424
143. Lai, N. Ca^{2+} and ion channels in hypoxia-mediated pulmonary hypertension / N. Lai, W. Lu, J. Wang // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2015. – Vol. 8(2). – P. 1081–1092.
144. Laporte, R. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle / R. Laporte, A. Hui, I. Laher // *Pharmacol. Rev.* – 2004. – Vol. 56(4). – P. 439–513.
145. Large conductance, Ca^{2+} -activated K^{+} channels (BKCa) and arteriolar myogenic signaling / M.A. Hill, Y. Yang, S.R. Ella et al. // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol. 584(10). – P. 2033–2042. doi: 10.1016/j.febslet.2010.02.045
146. Leffler, Ch.W. Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator / Ch.W. Leffler, H. Parfenova, J.H. Jaggar // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2011. – Vol. 301, N 1. – P. H1–H11. doi: 10.1152/ajpheart.00230.2011
147. Li, C. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury / C. Li, R.M. Jackson // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2002. – Vol. 282, N 2. – P. C227–C241.

148. Li, L. Hydrogen sulfide and cell signaling / L. Li, P. Rose, P.K. Moore // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2011. – Vol. 51. – P. 169–187. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010510-100505
149. Liu, Q. Constriction to hypoxia-reoxygenation in isolated mouse coronary arteries: role of endothelium and superoxide / Q. Liu // *J. Appl. Physiol.* – 1999. – Vol. 87(4). – P. 1392–1396.
150. Lowicka, E. Hydrogen sulfide – the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // *Pharmacol. Reports.* – 2007. – Vol. 59. – P. 4–24.
151. Madden, J.A. Changes in smooth muscle cell pH during hypoxic pulmonary vasoconstriction: a possible role for ion transporters / J.A. Madden, P.A. Keller, J.G. Kleinman // *Physiol. Res.* – 2000. – Vol. 49, N 5. – P. 561–566.
152. Maines, M.D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases / M.D. Maines // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1997. – Vol. 37. – P. 517–554.
153. Michelakis, E.D. The metabolic basis of vascular oxygen sensing: diversity, compartmentalization, and lessons from cancer / E.D. Michelakis, E.K. Weir // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 295, N 3. – P. H928–H930. doi: 10.1152/ajpheart.00697.2008
154. Michiels, C. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions / C. Michiels, Th. Arnould, J. Remacle // *Biochim. et Biophys. Acta (BBA) – Mol. Cell Res.* – 2000. – Vol. 1497, N 1. – P. 1–10.
155. Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects / G. Lenaz, R. Fato, M.L. Genova et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1757(9-10). – P. 1406–1420.
156. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing / R.D. Guzy, B. Hoyos, E. Robin et al. // *Cell Metab.* – 2005. – Vol. 1(6). – P. 401–408.

157. Mitochondrial reactive oxygen species and c-Src play a critical role in hypoxic response in vascular smooth muscle cells / H. Sato, M. Sato, H. Kanai et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2005. – Vol. 67(4). – P. 714–722.

158. Moody, B.F. Emergent role of gasotransmitters in ischemia-reperfusion injury [Electronic resource] / B.F. Moody, J.W. Calvert // *Med. Gas. Res.* – 2011. – 1(1). – URL: <http://medicalgasresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-9912-1-3> (дата обращения: 07.07.2014). doi: 10.1186/2045-9912-1-3

159. Muscle K_{ATP} channels: recent insights to energy sensing and myoprotection / T.P. Flagg, D. Enkvetchakul, J.C. Koster, C.G. Nichols // *Physiol. Rev.* – 2010. – Vol. 90, N 3. – P. 799–829. doi: 10.1152/physrev.00027.2009

160. Naik, J.S. Heme oxygenase-mediated vasodilation involves vascular smooth muscle cell hyperpolarization / J.S. Naik., B.R. Walker // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 285, N 1. – P. H220–H228. doi: 10.1152/ajpheart.01131.2002

161. Narayanan, D. Inositol trisphosphate receptors in smooth muscle cells / D. Narayanan, A. Adebisi, J.H. Jaggar // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2012. – Vol. 302, N 11. – P. H2190–H2210. doi: 10.1152/ajpheart.01146.2011

162. Nauta, T.D. Hypoxic Signaling During Tissue Repair and Regenerative Medicine / T.D. Nauta, V. van Hinsbergh, P. Koolwijk // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15. – P. 19791–19815. doi:10.3390/ijms151119791

163. Nicholson, C.K. Hydrogen sulfide and ischemia-reperfusion injury / C.K. Nicholson, J.W. Calvert // *Pharmacol Res.* – 2010. – Vol. 62(4). – P. 289–297. doi: 10.1016/j.phrs.2010.06.002

164. NKCC1 and hypertension: role in the regulation of vascular smooth muscle contractions and myogenic tone / S.N. Orlov, S.V. Koltsova, J. Tremblay et al. // *Ann. Med.* – 2012. – Vol. 44, Suppl. 1. – S111–S118. doi: 10.3109/07853890.2011.653395

165. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone / I.C. Villar, S. Francis, A. Webb et al. // *Kidney Int.* – 2006. – Vol. 70. – P. 840–853. doi:10.1038/sj.ki.5001680

166. Olson, K.R. Hydrogen sulfide and oxygen sensing: implications in cardiorespiratory control / K.R. Olson // *J. Exp. Biol.* – 2008. – Vol. 211(17). – P. 2727–2734. doi: 10.1242/jeb.010066

167. Olson, K.R. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor / K.R. Olson // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2013. – Vol. 51(3). – P. 623–632. doi: 10.1515/cclm-2012-0551

168. Origassa, Cl.S. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury / Cl.S. Origassa, N.O. Câmara // *World J. Hepatol.* – 2013. – Vol. 5(10). – P. 541–549.

169. Orlov, S.N. Intracellular monovalent ions as second messengers / S.N. Orlov, P. Hamet // *J. Membr. Biol.* – 2006. – Vol. 210, N 3. – P. 161–172.

170. Orlov, S.N. Ion transport in the pathogenesis of cardiovascular diseases: An update / S.N. Orlov // *Pathophysiology.* – 2007. – Vol. 14, N 3–4. – P. 133–134. doi: 10.1016/j.pathophys.2007.09.001

171. Otter, D. Hypoxia, metabolic inhibition, and isolated rat mesenteric tone: influence of arterial diameter / D. Otter, C. Austin // *Microvasc. Res.* – 2000. – Vol. 59(1). – P. 107–114.

172. Oxygen mediates vascular smooth muscle relaxation in hypoxia [Electronic resource] / J. Dada, A.G. Pinder, D. Lang, P.E. James // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8(2). – URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0057162>. (дата обращения: 20.03.2015). doi: 10.1371/journal.pone.0057162

173. Oxygen physiology: sensors and ion channels / Y. Mori, N. Takahashi, N. Ogawa, T. Gudermann // *Pflugers Arch.* – 2016. – Vol. 468(1). – P. 1–2. doi: 10.1007/s00424-015-1762-9

174. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation / J.K. Brunelle, E.L. Bell, N.M. Quesada et al. // *Cell Metab.* – 2005. – Vol. 1(6). – P. 409–414.

175. Oxygen sensors at the crossroad of metabolism / J. Aragonés, P. Fraisl, M. Baes, P. Carmeliet // *Cell Metab.* – 2009. – Vol. 9(1). – P. 11–22. doi: 10.1016/j.cmet.2008.10.001

176. Papapetropoulos, A. Pharmacology of the 'gasotransmitters' NO, CO and H₂S: translational opportunities / A. Papapetropoulos, R. Foresti, P. Ferdinandy // *Br. J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 172(6). – P. 1395–1396. doi: 10.1111/bph.13005

177. Peers, Ch. Emerging roles for gasotransmitters / Ch. Peers, D.J. Lefer // *Exp. Physiol.* – 2011. – Vol. 96, N 9. – P. 831–832. doi: 10.1113/expphysiol.2011.057422

178. Peers, Ch. Ion channels as target effectors for carbon monoxide / Ch. Peers // *Exp. Physiol.* – 2011. – Vol. 96(9). – P. 836–839. doi: 10.1113/expphysiol.2011.059063

179. Peng, W. Role of a novel K_{Ca} opener in regulating K⁺ channels of hypoxic human pulmonary vascular cells / W. Peng, J.R. Hoidal, I.S. Farrukh // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 20(4). – P. 737–745.

180. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells / E.A. Ko, J. Han, I.D. Jung, W.S. Park // *J. Smooth Muscle Res.* – 2008. – Vol. 44(2). – P. 65–81.

181. Polhemus, D.J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease / D.J. Polhemus, D.J. Lefer // *Circ. Res.* – 2014. – Vol. 114(4). – P. 730–737. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300505

182. Prabhakar, N.R. Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics / N.R. Prabhakar // *J. Physiol.* – 2013. – Vol. 591, N 9. – P. 2245–2257. doi: 10.1113/jphysiol.2012.247759

183. Properties of a native cation channel activated by Ca²⁺ store depletion in vascular smooth muscle cells / E.S. Trepakova, M. Gericke, Y. Hirakawa et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276(11). – P. 7782–7790. doi:10.1074/jbc.M010104200

184. Protective effect of hydrogen sulfide on balloon injury-induced neointima hyperplasia in rat carotid arteries / Q.H. Meng, G. Yang, W. Yang et al. // *Am. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 170(4). – P. 1406–1414. doi: 10.2353/ajpath.2007.060939

185. Protein kinases in vascular smooth muscle tone – role in the pulmonary vasculature and hypoxic pulmonary vasoconstriction / J.P. Ward, G.A. Knock, V.A. Snetkov, P.I. Aaronson // *Pharmacol. Ther.* – 2004. – Vol. 104(3). – P. 207–231.

186. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing / N.S. Chandel, D.S. McClintock, C.E. Feliciano et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275(33). – P. 25130-25138.

187. Reduction of Ca²⁺ channel activity by hypoxia in human and porcine coronary myocytes / T. Smani, A. Hernández, J. Ureña et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – Vol. 53(1). – P. 97–104. doi: 10.1016/S0008-6363(01)00422-9

188. Regulation of oxygen sensing by ion channels / J. López-Barneo, R. del Toro, K.L. Levitsky et al. // *J. Appl. Physiol.* – 2004. – Vol. 96, N 3. – P. 1187–1195. doi: 10.1152/jappphysiol.00929.2003.

189. Regulation of ROS Production and Vascular Function by Carbon Monoxide / Y.K. Choi, El.D. Por, Y.-G. Kwon, Y.-M. Kim // *Oxid. Med. Cell. Long.* – 2012 – Vol. 2012. – URL: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2012/794237> (дата обращения: 02.12.2015). doi: 10.1155/2012/794237

190. Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies / H.R. Girn, S. Ahilathirunayagam, Al. Mavor, S. Homer-Vanniasinkam // *Vasc. Endovascular. Surg.* – 2007. – Vol. 41(4). – P. 277–293.

191. Riddick, N. Targeting by myosin phosphatase-RhoA interacting protein mediates RhoA/ROCK regulation of myosin phosphatase / N. Riddick, K. Ohtani,

H.K. Surks // *J. Cell. Biochem.* – 2008. – Vol. 103(4). – P. 1158–1170. doi: 10.1002/jcb.21488

192. Role of Hydrogen Sulfide in Ischemia-Reperfusion Injury [Electronic resource] / D. Wu, J. Wang, H. Li et al. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2015. – URL: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/186908> (дата обращения: 20.11.2015). doi: 10.1155/2015/186908

193. Role of InsP3 and ryanodine receptors in the activation of capacitative Ca²⁺ entry by store depletion or hypoxia in canine pulmonary arterial smooth muscle cells / L.C. Ng, S.M. Wilson, C.E. McAllister, J.R. Hume // *Br. J. Pharmacol.* – 2007 – Vol. 152(1). – P. 101–111.

194. Role of thromboxane A₂-activated nonselective cation channels in hypoxic pulmonary vasoconstriction of rat / H.Y. Yoo, S.J. Park, E.-Y. Seo et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2011. – Vol. 302. – P. C307–C317. doi:10.1152/ajpcell.00153.2011

195. Russell, M.J. Effects of hypoxia on vertebrate blood vessels / M.J. Russell, R.A. Dombkowski, K.R. Olson // *J. Exp. Zool. Ecol. Genet. Physiol.* – 2008. – Vol. 309(2). – P. 55–63. doi: 10.1002/jez.427

196. Ryter, S.W. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications / S.W. Ryter, J. Alam, A.M. Choi // *Physiol. Rev.* – 2006. – Vol. 86, N 2. – P. 583–650.

197. Sanders, K.M. Invited review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles / K.M. Sanders // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – Vol. 91(3). – P. 1438–1449.

198. Schild, L. Oxidative stress is involved in the permeabilization of the inner membrane of brain mitochondria exposed to hypoxia/reoxygenation and low micromolar Ca²⁺ / L. Schild, G. Reiser // *FEBS J.* – 2005. – Vol. 272. – P. 3593–3601. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04781.x

199. Searcy, D.G. Sulfur reduction by human erythrocytes / D.G. Searcy, S.H. Lee // *J. Exp. Zool.* – 1998. – Vol. 282. – P. 310–322.

200. Semenza, Gr.L. Vascular responses to hypoxia and ischemia / Gr.L. Semenza // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2010. – Vol. 30(4). – P. 648–652. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.181644

201. Semenza, Gr.L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine / Gr.L. Semenza // *Cell.* – 2012. – Vol. 148(3). – P. 399–408. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.021

202. Semenza, Gr.L. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1 / Gr.L. Semenza // *Physiology* – 2009. – Vol. 24, N 2. – P. 97–106. doi: 10.1152/physiol.00045.2008

203. Shimoda, L.A. Hypoxia. 4. Hypoxia and ion channel function / L.A. Shimoda, J. Polak // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2011. – Vol. 300, N 5. – P. C951–C967. doi: 10.1152/ajpcell.00512.2010

204. Shirwany, N.A. AMPK: a cellular metabolic and redox sensor. A minireview / N.A. Shirwany, M.H. Zou // *Front. Biosci. (Landmark Ed).* – 2014. – Vol. 19. – P. 447–474.

205. Simkhovich, B.Z. Role of protein kinase C in ischemic "conditioning": from first evidence to current perspectives / B.Z. Simkhovich, K. Przyklenk, R.A. Kloner // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2013. – Vol. 18(6). – P. 525–532. doi: 10.1177/1074248413494814

206. Sims, N.R. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke\\ N.R. Sims, H. Muyderman // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1802. – P. 80–91. doi:10.1016/j.bbadis.2009.09.003

207. SKCa and IKCa channels, myogenic tone, and vasodilator responses in middle cerebral arteries and parenchymal arterioles: effect of ischemia and reperfusion / M.J. Cipolla, J. Smith, M.M. Kohlmeyer, J.A. Godfrey // *Stroke.* – 2009. – Vol. 40. – P. 1451–1457. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.535435

208. Smith, Th.G. The human side of hypoxia-inducible factor / Th.G. Smith, P.A. Robbins, P.J. Ratcliffe // *Br. J. Haematol.* – 2008. – Vol. 141(3). – P. 325–334. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07029.x

209. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP / T. Morita, M.A. Perrella, M.E. Lee, S. Kourembanas // *Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92, N 5. – P. 1475–1479.

210. Standen, N.B. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle / N.B. Standen, J.M. Quayle // *Acta Physiol. Scand.* – 1998. – Vol. 164, N 4. – P. 549–557. doi: 10.1046/j.1365-201X.1998.00433.x

211. Stec, D.E. Role of carbon monoxide in blood pressure regulation / D.E. Stec, H.A. Drummond, T. Vera // *Hypertension.* – 2008. – Vol. 51(3). – P. 597–604. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.097154

212. Taggart, M.J. Hypoxia and smooth muscle function: key regulatory events during metabolic stress / M.J. Taggart, S. Wray // *J. Physiol.* – 1998. – Vol. 509 (2). – P. 315–325.

213. Tang, C. Hydrogen sulfide as a new endogenous gaseous transmitter in the cardiovascular system / C. Tang, X. Li, J. Du // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 4(1). – P. 17–22.

214. Tano, J.Y. Hypoxia and ischemia-reperfusion: a BiK contribution? / J.Y. Tano, M. Gollasch // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2014. – Vol. 307, N 6. – P. H811–H817. doi: 10.1152/ajpheart.00319.2014

215. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases / T.L. Leto, S. Morand, D. Hurt, T. Ueyama // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2009. – Vol. 11, N 10. – P. 2607–2619. doi: 10.1089/ARS.2009.2637

216. The impact of hydrogen sulfide (H₂S) on neurotransmitter release from the cat carotid body / R.S. Fitzgerald, M. Shirahata, Ir. Chang et al. // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2011. – Vol. 176(3). – P. 80–89. doi: 10.1016/j.resp.2011.01.010

217. The Na⁺/K⁺-ATPase as [K⁺]_o sensor: Role in cardiovascular disease pathogenesis and augmented production of endogenous cardiotonic steroids / O. Akimova, J. Tremblay, P. Hamet, S.N. Orlov // *Pathophysiology.* – 2006. – Vol. 13, N 4. – P. 209–216. doi: 10.1016/j.pathophys.2006.06.001

218. The role of endogenous H₂S in cardiovascular physiology / N. Skovgaard, A. Gouliaev, M. Aalling, U. Simonsen // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 12, N 9. – P. 1385–1393.

219. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang // *EMBO J.* – 2001. – Vol. 20(21). – P. 6008–6016. doi: 10.1093/emboj/20.21.6008

220. Thorne, G.D. Hypoxic vasorelaxation: Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms / G.D. Thorne, Y. Ishida, R.J. Paul // *Cell Calcium.* – 2004. – Vol. 36, N 3-4. – P. 201–208.

221. Thorneloe, K.S. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility / K.S. Thorneloe, M.T. Nelson // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 83(3). – P. 215–242.

222. Transcriptomic changes in Ca²⁺-depleted cells: Role of elevated intracellular [Na⁺]/[K⁺] ratio / S.V. Koltsova, J. Tremblay, P. Hamet, S.N. Orlov // *Cell Calcium.* – 2015. – Vol. 58, N 3. – P. 317–224. doi: 10.1016/j.ceca.2015.06.009

223. Ubiquitous [Na⁺]_i/[K⁺]_i-sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca²⁺_i-independent excitation-transcription coupling [Electronic resource] / S.V. Koltsova, Y. Trushina, M. Haloui et al. / *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(5). – URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/0038032> (дата обращения: 04.07.2014). doi: 10.1371/journal.pone.0038032

224. Untereiner, A.A. The role of carbon monoxide as a gasotransmitter in cardiovascular and metabolic regulation / A.A. Untereiner, L. Wu, R. Wang // *Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology* / A. Hermann, G.F. Sitdikova, Th.M. Weiger. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. – P. 37–70.

225. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide / N. Shibuya, Y. Milkanai, Y. Kimura et al. // *J. Biochem. Advance Access.* – 2009. – Vol. 146. – P. 623–626.

226. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells / J.J. Lim, Y.H. Liu, E.S. Win-Khin et al. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – P. 1261–1270.

227. Wagner, C.A. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator / C.A. Wagner // *J. Nephrol.* – 2009. – Vol. 22(2). – P. 173–176.

228. Wallace, J.L. Hydrogen Sulfide: An Endogenous Mediator of Resolution of Inflammation and Injury / J.L. Wallace, J.G. Ferraz, M.N. Muscara // *Antioxid. Redox Signal.* – 2012. – Vol. 17(1). – P. 58–67. doi: 10.1089/ars.2011.4351

229. Walshe, T.E. The role of hypoxia in vascular injury and repair / T.E. Walshe, P.A. D'Amore // *Annu. Rev. Pathol.* – 2008. – Vol. 3. – P. 615–643.
Wang, R. Gasotransmitters: growing pains and joys / R. Wang // *Trends Biochem. Sci.* – 2014. – Vol. 39(5). – P. 227–232. doi: 10.1016/j.tibs.2014.03.003

230. Wang, R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? / R. Wang // *FASEB J.* – 2002. – Vol. 16, N 13. – P. 1792–1798.

231. Ward, J.B. Oxygen in the regulation of intestinal epithelial transport / J.B. Ward, S.J. Keely, S.J. Keely // *J. Physiol.* – 2014. – Vol. 592, N 12. – P. 2473–2489. doi: 10.1113/jphysiol.2013.270249

232. Waypa, G.B. O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting / G.B. Waypa, K.A. Smith, P.T. Schumacker // *Mol. Aspects Med.* – 2016. – Vol. 47–48. – P. 76–89. doi: 10.1016/j.mam.2016.01.002

233. Weir, E.K. Role of ion channels in acute and chronic responses of the pulmonary vasculature to hypoxia / E.K. Weir, A. Olschewski // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – Vol. 71(4). – P. 630–641. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.04.014

234. Wellman, G.C. Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca²⁺-sensitive ion channels / G.C. Wellman, M.T. Nelson // *Cell Calcium.* – 2003. – Vol. 34, N 3. – P. 211–229. doi: 10.1016/S0143-4160(03)00124-6

235. Wenger, R.H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression / R.H. Wenger // *FASEB J.* – 2002. – Vol. 16, N 10. – P. 1151–1162.

236. Wilkinson, W.J. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels / W.J. Wilkinson, P.J. Kemp // *J. Physiol.* – 2011. – Vol. 589, N 13. – P. 3055–3062. doi: 10.1113/jphysiol.2011.206706

237. Wolin, M.S. Reactive oxygen species and the control of vascular function / M.S. Wolin // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2009. – Vol. 296, N 3. – P. H539–H549. doi: 10.1152/ajpheart.01167.2008

238. Wong, R. Mitochondrial permeability transition pore and calcium handling / R. Wong, Ch. Steenbergen, E. Murphy // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 810. – P. 235–242. doi:10.1007/978-1-61779-382-0_15

239. Wu, L. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications / L. Wu, R. Wang // *Pharmacol. Rev.* – 2005. – Vol. 57(4). – P. 585–630. doi: 10.1124/pr.57.4.3

240. Yang, H. BK channels: multiple sensors, one activation gate // H. Yang, G. Zhang, J. Cui // *Front. Physiol.* – 2015. – Vol. 6(29). – URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2015.00029/full> (дата обращения: 02.12.2015). doi: 10.3389/fphys.2015.00029

241. Zhao, W. Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues / W. Zhao, J.F. Ndisang, R. Wang // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 81(9). – P. 848–853.

242. Zhao, Y. Hydrogen sulfide (H₂S) releasing agents: chemistry and biological applications / Y. Zhao, T.D. Biggs, M. Xian // *Chem. Commun.* – 2014. – Vol. 50. – P. 11788–11805.