

ВЛИЯНИЕ МОНОКСИДА УГЛЕРОДА И СЕРОВОДОРОДА НА ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ИОННЫЙ ТРАНСПОРТ

© 2017 г. С.В. Гусакова*, И.В. Ковалев*, Ю.Г. Бирулина*, Л.В. Смаглий** **,
И.В. Петрова*, А.В. Носарев* **, А.Н. Алейник**, С.Н. Орлов* ***

*Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск, Московский тракт, 2;

**Томский политехнический университет, 634050, Томск, пр. Ленина, 2;

***Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1/12

E-mail: gusacova@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.05.16 г.

После доработки 02.07.16 г.

Исследована активность электронейтрального транспорта ионов в ответ на воздействие газотрансмиттеров – монооксида углерода и сероводорода. Показано, что активатор рецептор-управляемого входа кальция в клетку фенилэфрин усиливал релаксирующее влияние монооксида углерода и сероводорода. Угнетение калиевой проводимости мембраны, особенно ее потенциал-зависимого компонента, наоборот, ослабляло миогенные эффекты монооксида углерода в гладких мышцах. Направленность эффекта сероводорода зависела от его концентрации и способа инициации транспортных систем клеток. Кроме того, в реализацию эффектов этого газотрансмиттера на ион-транспортные системы в дополнение к кальциевой и калиевой составляющей подключаются натрий-зависимые компоненты проводимости мембраны. Все это расширяет диапазон возможных эффекторных мишеней сигнальных путей воздействия газомедиаторов, итогом чего может быть как активация, так и угнетение функции клеток. Результаты такого влияния на функционально значимые реакции со стороны отдельных клеток, органов и систем должны учитываться при различных физиологических и патологических состояниях.

Ключевые слова: монооксид углерода, сероводород, калиевая проводимость мембраны, $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорт, гладкомышечные клетки.

Группа газовых трансмиттеров продолжает увеличиваться, и в настоящее время включает помимо монооксида азота (NO) монооксид углерода (CO), сероводород (H_2S), другие газы (CH_4, NH_3) и некоторые молекулы из обширной группы активных форм кислорода. Газомедиаторы продуцируются практически всеми клетками, а благодаря высокой липофильности вовлечены во многие механизмы внутри- и межклеточной коммуникации, что указывает на значимость данных агентов в регуляции жизнедеятельности клеток, тканей и организма в целом [1–3]. Существенный прогресс в исследованиях реакций, опосредованных газотрансмиттерами, достигнут в связи с открытием способности некоторых химических соединений воспроизво-

дить эффекты данных сигнальных молекул, действуя в качестве их доноров.

Основные мембранные и молекулярные системы, реализующие передачу подобных сигналов, механизмы и пути взаимодействия газотрансмиттеров с «классическими» посредниками (Ca^{2+} , циклические нуклеотиды), за исключением, может быть, NO, находятся на начальной стадии изучения.

В последние годы пристальное внимание уделяется идентификации ион-транспортующих систем клеток, задействованных в эффектах газомедиаторов [4–6]. На примере гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов и висцеральных органов показано, что они способны влиять на их сократительные свойства, модулируя состояние ионных каналов мембран клеток прямо – путем химической модификации белков каналов или косвенно – через подключение вторичных посредников [7,8]. Отмечается, что CO и H_2S , так же как и NO, повышают проницаемость мембран клеток для ионов K^+ за счет активации

Сокращения: ГМК – гладкомышечные клетки, ФЭ – фенилэфрин, CORM-2 – бис-дихлорид трикарбонилрутения, ПД – потенциал действия, NKCC – $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорт.

различных компонентов (потенциал-зависимого, кальций-активируемого, АТФ-чувствительного) калиевой проводимости мембран ГМК [7,9,10], но вклад каждого из них в механизмы регуляции сопряжения возбуждения–сокращения в гладких мышцах изучен недостаточно. Имеются также данные, указывающие, что СО и H_2S способны снижать кальциевые токи через Ca^{2+} -каналы L-типа [11–13]. При этом нет достаточной ясности и в определении роли электронеutralного ионного транспорта, обусловленного оперированием $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ - и K^+, Cl^- -котранспортеров, основной функцией которых является регуляция объема клеток и поддержание внутриклеточного гомеостаза моновалентных ионов. На эндотелиальных клетках крысы показано, что H_2S инвертировал работу $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ -обменника, обуславливая вход Ca^{2+} в клетку [14], а ингибитор данного обменника KB-R7943, в свою очередь, устранял подобное стимулирующее влияние NaHS [15].

Таким образом, несмотря на определенные успехи, достигнутые в освоении внутриклеточной сигнализации, опосредованной газовыми посредниками, остается ряд нерешенных вопросов о механизмах влияния СО и H_2S на ион-транспортные системы цитоплазматических мембран.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование сократительных реакций гладких мышц сосудов выполняли на деэндоthелизированных сегментах грудного отдела аорты половозрелых крыс-самцов линии Wistar (40 особей), которых умерщвляли методом цервикальной дислокации под глубоким наркозом (нембутал в дозе 70 мг/кг, интраперитонеально) в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Регистрацию механического напряжения сегментов аорты проводили в изометрическом режиме с помощью механографической установки Myobath II и аппаратно-программного комплекса LAB-TRAX-4/16 (Германия). Подготовленные препараты фиксировали в аэрируемых камерах, заполненных стандартным физиологическим раствором Кребса (в мМ: NaCl – 120,4, KCl – 5,9, CaCl_2 – 2,5, MgCl_2 – 1,2, глюкоза – 5,5, трис – 15), термостатируемых при 37°C, pH 7,35–7,40. После 40–50-минутного выдерживания в нормальном растворе Кребса индуцировали сокращение сосудистых сегментов гиперкалиевым раствором Кребса (эквивалентное замещение 30 мМ NaCl на KCl), а в ряде экспериментов – фенилэфрином (ФЭ, 1 мкМ), амплитуду сократительных ответов на

которые считали контрольными (100%). В качестве донора СО использовали бис-дихлорид трикарбонилрутения (CORM-2), а донора H_2S – гидросульфид натрия (NaHS) [5,7].

Изменение параметров электрической и сократительной активности гладких мышц исследовали методом двойного сахарозного моста на изолированных гладкомышечных препаратах мочеочника морской свинки (30 особей). Данная методика позволяет одновременно регистрировать вызванные электрическим стимулом потенциал действия (ПД) и сокращение ГМК. Сегменты мочеочника фиксировали в камере установки, перфузируемой физиологическим раствором Кребса, ограниченной с двух сторон сахарозными секциями (0,3 М раствор сахарозы с удельным сопротивлением 15 МОм·см). Отведение электрических потенциалов производили при помощи неполяризующихся электродов. Механическое напряжение гладкомышечных препаратов регистрировали изометрическим датчиком силы FT10G, соединенным с 14-битным АЦП L-791 («Л-КАРД», Россия). Полученные сигналы обрабатывали с использованием соответствующего программного обеспечения (LGraph2, «Л-КАРД», Россия). В качестве контрольных (100%) служили значения параметров ПД (амплитуда пикового компонента, длительность плато) и амплитуды сокращений ГМК при действии деполаризующего стимула в растворе Кребса.

Изучение активности $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта (НКСС) проводили с помощью радионуклидного метода на изолированных ГМК аорты крысы, которые использовали в трех-восьми пассажах (Lonza, США). Активность НКСС изучали как буметанид-чувствительный компонент входа $^{86}\text{Rb}^+$. Клетки высевали в 24-луночные планшеты, промывали два раза с 2 мл аликвоты среды, содержащей 150 мМ NaCl и 10 мМ HEPES-трис-буфера (pH 7,4). Затем среду удаляли и добавляли 0,25 мл раствора, содержащего 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 1 мМ CaCl_2 , 5 мМ глюкозы, 20 мМ HEPES-трис-буфера (pH 7,4) и исследуемые соединения. Через 10 мин инкубации при 37°C с 0,25 мл среды, содержащей 1–2 мкКи/мл $^{86}\text{Rb}^+$ в присутствии или в отсутствие буметанида (20 мкМ), поглощение изотопа было прекращено путем добавления 2 мл ледяной среды, содержащей 100 мМ MgCl_2 и 10 мМ HEPES-трис-буфера (pH 7,4). Клетки промывали три раза, затем лизировали (1% SDS/4 мМ ЭДТА). Радиоактивность среды инкубации и клеточного лизата измеряли с помощью жидкостного сцинтилляционного анализатора. Скорость V входа $^{86}\text{Rb}^+$ (K^+) (в нмоль на мг белка за

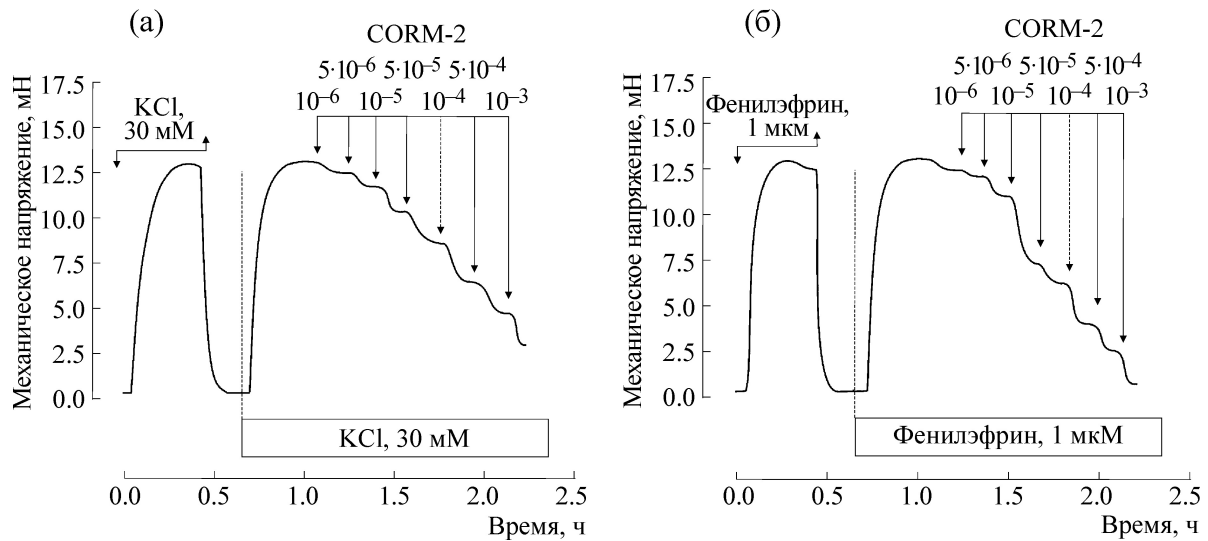


Рис. 1. Влияние CORM-2 на сокращения ГМК аорты крысы, индуцированные гиперкалиевым раствором Кребса (а) и фенилэфрином (б). По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (часы). Стрелками указано добавление и удаление соответствующих растворов.

10 мин) рассчитывали как $V = A/a \cdot m \cdot t$, где A – радиоактивность клеточного лизата (в срм), a – радиоактивность $^{86}\text{Rb}^+$ в среде инкубации (срм/нмоль), m – содержание белка в клеточном лизате (мг), t – время инкубации клеток с изотопом (10 мин).

Изучение Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости (Gardos-каналов) мембраны эритроцитов выполняли потенциометрическим методом непрерывной регистрации мембранного потенциала клеток по изменениям рН среды, основанным на том, что в присутствии протонофора СССР (carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazon, 20 мкМ) распределение H^+ зависит от мембранного потенциала как $E_m = (\text{pH}_i - \text{pH}_0) \cdot RT/F$, где pH_i и pH_0 – значения рН цитоплазмы и среды инкубации соответственно. Для получения Ca^{2+} - и редокс-стимулированного гиперполяризационного ответа в среду инкубации клеток вносили Ca^{2+} -ионофор A23187 (0,5 мкМ), либо искусственную электронно-донорную систему аскорбат (10 мМ)–феназинметосульфат (0,1 мМ). В обоих случаях развивался гиперполяризационный ответ мембраны эритроцитов, амплитуда которого отражала активность Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов (K_{Ca} -каналов). NaHS добавляли за 5 мин до внесения в суспензию эритроцитов агентов, вызывающих гиперполяризационный ответ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы SPSS Statistics 17.0.1 for Windows. Достоверность различий определяли непараметрическими критериями – U -критерием Манна–Уитни

для независимых и T -критерием Вилкоксона для зависимых выборок. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_1 ; Q_3).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние монооксида углерода на электрические и сократительные свойства ГМК сосудов и мочеочника. Донор СО – CORM-2 – в концентрациях от 1 до 1000 мкМ не оказывал влияния на исходное механическое напряжение гладкомышечных сегментов аорты крысы. Однако аппликация CORM-2 в этом же диапазоне концентраций на фоне гиперкалиевой контрактуры ГМК приводила к дозозависимому снижению механического напряжения сосудистых сегментов (рис. 1а). Расслабление, близкое к полумаксимальному, наблюдалось в ответ на действие 100 мкМ CORM-2: амплитуда сократительного ответа ГМК составила 57,1 (53,9; 61,2)% ($n = 10$, $p < 0,05$) от контрольного гиперкалиевого сокращения. Добавление CORM-2 (1–1000 мкМ) на фоне сокращений сегментов аорты крысы, вызванных стимуляцией α_1 -адренергических рецепторов ФЭ (1 мкМ), также приводило к дозозависимому снижению сократительной реакции сосудистых ГМК (рис. 1б). Расслабление, близкое к полумаксимальному, наблюдалось в ответ на действие 10 мкМ CORM-2: амплитуда сокращения составила 58,4 (52,6; 67,4)% ($n = 10$, $p < 0,05$) от контрольного ФЭ-индуцированного. Таким образом, в случае использования в качестве предсокращающего агента агониста α_1 -адрено-

Таблица 1. Влияние CORM-2 и NaHS на параметры электрической и сократительной активности гладких мышц мочеточника морской свинки, Me (Q_1 ; Q_3)

Группа	CORM-2			NaHS		
	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ	10 мкМ	100 мкМ	1000 мкМ
Контроль, %	100	100	100	100	100	100
Амплитуда сокращения, %	98,6 (92,1; 102,8)	81,5* (76,3; 90,6)	73,3* (68,5; 81,1)	121,9* (110,4; 132,5)	143,1* (130,4; 156,5)	154,7* (142,4; 168,9)
Амплитуда ПД, %	89,2* (80,2; 105,0)	82,9* (78,7; 93,1)	70,8* (65,4; 83,2)	103,6 (96,4; 110,2)	107,1* (98,8; 113,3)	111,5* (91,4; 123,1)
Длительность плато ПД, %	96,7 (92,4; 105,7)	81,7* (77,6; 92,7)	69,8* (61,5; 74,2)	105,7 (95,7; 114,4)	109,3* (95,7; 115,9)	115,9* (99,8; 126,6)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

рецепторов ФЭ концентрация CORM-2, обеспечивающая полумаксимальный релаксирующий эффект, была на порядок ниже.

При добавлении CORM-2 в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ в перфузионный раствор исходные параметры электрической и сократительной активности гладкомышечных полосок мочеточника не изменялись. Однако присутствие донора в растворе Кребса после нанесения деполяризующего стимула вызывало дозозависимое уменьшение величины амплитуды сокращения ГМК, амплитуды и длительности плато ПД по сравнению с контрольными ответами на стимул в физиологическом растворе (табл. 1). В условиях действия 10 мкМ ФЭ происходило достоверное усиление угнетающих эффектов донора CO на электрические и сократительные свойства ГМК мочеточника ($p < 0,05$).

Влияние сероводорода на электрические и сократительные свойства гладких мышц сосудов

и мочеточника. Донор H_2S – NaHS – в концентрациях от 5 до 1000 мкМ не влиял на исходное механическое напряжение сосудистых сегментов, однако оказывал разнонаправленные эффекты на их сократительные реакции. В концентрациях 5–50 мкМ NaHS вызывал дополнительный прирост механического напряжения, 500 и 1000 мкМ – расслабление сосудистых ГМК. При действии 100 мкМ NaHS наблюдался двухфазный ответ: увеличение амплитуды гиперкалиевого сокращения ГМК с последующим его угнетением (рис. 2а). В последующих экспериментах исследовали изменение вазорелаксирующего эффекта NaHS (500 мкМ), вызывающего снижение амплитуды гиперкалиевой контрактуры до 63,3 (50,2; 69,7)% ($n = 6$, $p < 0,05$) по сравнению с контрольной. Аппликация NaHS (1–1000 мкМ) на фоне ФЭ-индуцированных сокращений ГМК аорты крысы приводила к дозозависимому угнетению сократительной

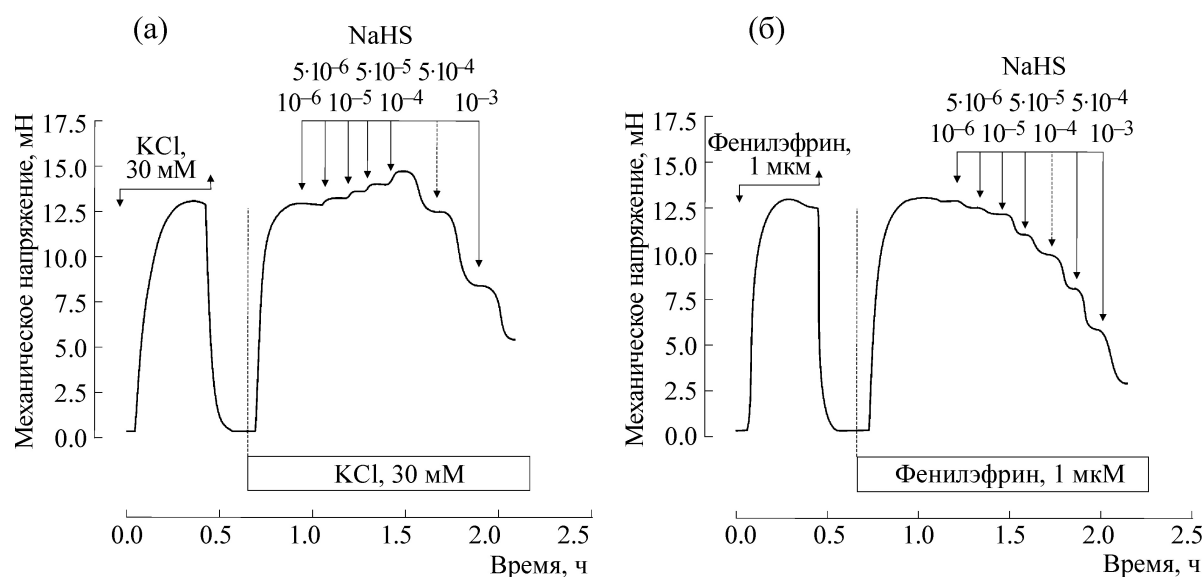


Рис. 2. Влияние NaHS на сокращения ГМК аорты крысы, индуцированные гиперкалиевым раствором Кребса (а) и фенилэфрином (б). Обозначения, как на рис. 1.

Таблица 2. Влияние CORM-2 и NaHS на электрические и сократительные свойства ГМК мочеточника на фоне блокирования калиевых каналов, Me (Q_1 ; Q_3)

Группа	CORM-2, 10 мкМ	CORM-2 + тетраэтиламмоний, 5 мМ	CORM-2 + 4- аминопиридин, 1 мМ	NaHS, 100 мкМ	NaHS + тет- раэтиламмоний, 5 мМ	NaHS + 4- аминопиридин, 1 мМ
Контроль, %	100	100	100	100	100	100
Амплитуда сокращения, %	81,5* (76,3; 90,6)	91,2*# (82,8; 99,2)	93,8*# (86,6; 98,5)	143,1* (130,4; 156,5)	139,4*# (128,2; 147,4)	125,1*# (108,7; 135,9)
Амплитуда ПД, %	82,9* (78,7; 93,1)	90,7*# (88,3; 97,1)	95,1*# (90,1; 103,5)	107,1* (98,8–113,3)	102,9# (92,1–109,3)	97,2# (84,6–111,5)
Длительность плато ПД, %	81,7* (77,6; 92,7)	94,6*# (83,2; 100,9)	93,8*# (89,4; 98,7)	109,3* (95,7; 115,9)	108,5* (91,9; 117,7)	96,8# (85,6; 115,5)

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ по сравнению с действием CORM-2 или NaHS в отсутствие блокатора.

активности сосудистых гладкомышечных сегментов (рис. 2б). Близкий к полумаксимальному расслабляющий эффект наблюдали в ответ на действие 100 мкМ NaHS: амплитуда сокращений ГМК составила 58,6 (51,6; 60,4)% ($n = 6$, $p < 0,05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. Таким образом, характер изменений механического напряжения гладкомышечных сегментов аорты крысы зависел не только от действующей концентрации донора H_2S , но и от способа генерации их сокращений.

Донор H_2S в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ оказывал активирующее влияние на электрические и сократительные свойства гладких мышц мочеточника, вызывая дозозависимое увеличение амплитуды сокращения, показателей ПД (табл. 1). В присутствии 10 мкМ ФЭ донор H_2S в исследуемых концентрациях усиливал свои стимулирующие эффекты ($p < 0,05$).

Роль калиевой проводимости мембраны ГМК в эффектах газомедиаторов. Взаимодействие газотрансмиттеров с ионными каналами мембраны рассматривается как важнейший механизм реализации их действия на сократительные и электрические свойства ГМК. Предполагается, что эффекты газов могут быть связаны не только с влиянием на кальциевую, но и с изменением калиевой проводимости мембраны ГМК.

В присутствии неизбирательного блокатора калиевых каналов – тетраэтиламмония (10 мМ) – ослаблялось релаксирующее действие CORM-2 на сосудистые сегменты, предсокращенные 30 мМ KCl или ФЭ, на 24,3% ($n = 8$, $p < 0,05$) и 21% ($n = 8$, $p < 0,05$) соответственно, по сравнению с величиной амплитуды в отсутствие блокатора. После 10-минутной предобработки сосудистых сегментов 1 мМ 4-аминопиридина (блокатора потенциал-зависимых калиевых ка-

налов) величина расслабления, вызванная добавлением CORM-2 на фоне гиперкалиевой или ФЭ-индуцированной контрактуры, достоверно снижалась на 29% ($n = 8$, $p < 0,05$) и 25% ($n = 8$, $p < 0,05$) соответственно. Добавление в перфузионный раствор 5 мМ тетраэтиламмония или 1 мМ 4-аминопиридина также приводило к достоверному ослаблению влияния 10 мкМ CORM-2 на параметры ПД и амплитуду сокращений ГМК мочеточника морской свинки при действии деполяризующего стимула.

При аппликации 10 мМ тетраэтиламмония или 1 мМ 4-аминопиридина релаксирующее действие 500 мкМ NaHS на сосудистые ГМК, предсокращенные 30 мМ хлоридом калия, достоверно снижалось на 13,9% ($n = 6$, $p < 0,05$) и 19,5% ($n = 6$, $p < 0,05$) соответственно по сравнению с эффектами донора в отсутствие блокатора. Величина расслабления сегментов аорты крысы, предсокращенных ФЭ, в ответ на действие 100 мкМ NaHS на фоне тетраэтиламмония (10 мМ) достоверно уменьшилась на 13,8% ($n = 6$, $p < 0,05$), 4-аминопиридина – 16,2% ($n = 8$, $p < 0,05$). В то же время тетраэтиламмоний в концентрации 5 мМ значимо не влиял на изменение активирующего действия 100 мкМ NaHS на сокращения ГМК и параметры ПД мочеточника морской свинки. Предобработка 4-аминопиридином (1 мМ) вызвала достоверное снижение эффектов донора H_2S на гладкие мышцы мочеточника (табл. 2).

Неоднозначность влияния NaHS на калиевую проводимость мембраны ГМК потребовала уточнения, для чего провели исследование на суспензии эритроцитов, поскольку их мембрана содержит только K_{Ca} -каналы [16].

Добавление в среду инкубации клеток NaHS в концентрациях от 0,005 мМ до 0,3 мМ приводило к изменению амплитуды гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов, вы-

званного как с помощью кальциевого ионофора A23187, так и редокс-системы аскорбат–феназинметосульфат. В отсутствие донора амплитуда A23187- и редокс-зависимого гиперполяризационного ответа составила 22,1 (20,8; 22,6) мВ ($n = 25$, $p < 0,01$) и 49,8 (49,6; 50,7) мВ ($n = 25$, $p < 0,01$) соответственно. Инкубация эритроцитов с различными концентрациями NaHS привела к неодинаковым изменениям амплитуды гиперполяризационного ответа. Так, в присутствии 0,005 мМ NaHS амплитуда A23187-зависимого гиперполяризационного ответа существенно увеличивалась, а редокс-зависимого – снижалась по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,01$). Внесение в среду инкубации эритроцитов более высоких концентраций NaHS (0,01–0,3 мМ) приводило к снижению амплитуды гиперполяризационного ответа, вызванного обоими способами. Следует отметить, что подавление A23187-зависимого гиперполяризационного ответа в присутствии 0,15–0,3 мМ NaHS было более выраженным, чем редокс-зависимого. Полученные данные свидетельствуют о различном влиянии сероводорода на активность K_{Ca} -каналов, стимулированных разными способами.

Исследование влияния газотрансмиттеров на активность $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорта. Предобработка ингибитором $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорта – буметанидом (100 мкМ) в течение 15 мин – приводила к угнетению релаксирующего действия донора CO на сегменты аорты крысы, предсокращенные 30 мМ KCl или ФЭ на 10,5% ($n = 6$, $p < 0,05$) и на 8,4% ($n = 6$, $p < 0,05$) соответственно. На фоне действия 100 мкМ буметанида добавление CORM-2 (10 мкМ) вызывало достоверное угнетение амплитуды сокращения на 13,3%, амплитуды и длительности плато ПД гладких мышц мочеточника на 14,2 и 10,3% ($n = 8$, $p < 0,05$) соответственно, по сравнению со значениями в отсутствие ингибитора.

Предобработка сегментов аорты крысы буметанидом (100 мкМ) также устраняла констрикторное действие малых концентраций NaHS (5–100 мкМ) на сосудистые ГМК, предсокращенные гиперкалиевым раствором ($n = 7$, $p < 0,05$). Исследование активности НКСС как буметанид-чувствительного компонента входа $^{86}Rb^+$ позволило установить, что добавление в среду инкубации 5, 10 и 500 мкМ NaHS не оказывало статистически значимого влияния на активность данного переносчика. Однако в присутствии 50 и 100 мкМ NaHS активность НКСС достоверно увеличивалась (рис. 3). Ингибирование НКСС буметанидом (100 мкМ) значимо снижало и влияние NaHS (100 мкМ) на пара-

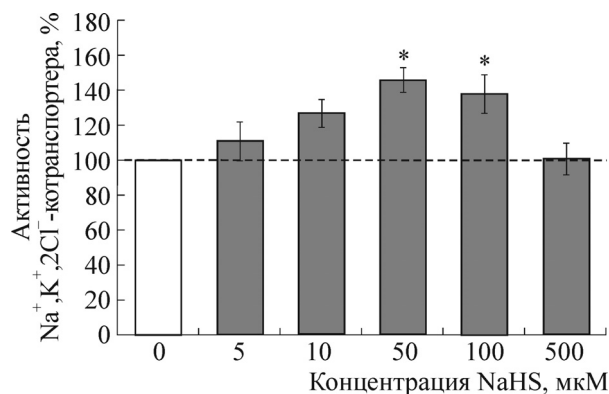


Рис. 3. Влияние гидросульфида натрия на активность $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспортера; * $p < 0,05$ по сравнению с отсутствием в среде инкубации NaHS. Данные получены в трех независимых экспериментах, выполненных в четырех пробах.

метры электрической и сократительной активности ГМК мочеточника ($p < 0,05$).

Действие NaHS на амплитуду гиперполяризационного ответа эритроцитов в присутствии буметанида (5 мкМ) также зависело от способа его стимуляции. Так, амплитуда A23187-зависимого гиперполяризационного ответа при совместном действии NaHS и буметанида оказалась достоверно выше по сравнению с параметром, полученным в отсутствие буметанида ($p < 0,01$). В то же время амплитуда редокс-стимулированного гиперполяризационного ответа эритроцитов, напротив, существенно снижалась по сравнению со значениями в отсутствие буметанида.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из центральных вопросов изучения регуляции функции клеток является идентификация систем, реализующих эффекты возмущений в системе внутриклеточной коммуникации. Основная роль в этих процессах отводится потенциал-зависимым и рецептор-управляемым (малоселективным) ионным каналам мембраны.

Нами было установлено дозозависимое угнетающее влияние CO на параметры электрической и сократительной активности ГМК аорты крысы и мочеточника морской свинки, которое, вероятно, связано именно с изменением ионной проводимости их мембран и/или с вовлечением одного или нескольких звеньев сети внутриклеточных регуляторных систем. Известно, что характерной чертой сопряжения возбуждения–сокращения в ГМК является поступление внеклеточных ионов кальция [17,18]. Повышение их концентрации внутри клетки можно воспроизводить с помощью физиологически

активных веществ, например α_1 -адренергических воздействий. Связываясь со своим рецептором на плазматической мембране гладких мышц, они не только обеспечивают рецептор-управляемый вход Ca^{2+} в клетку, но и дополнительно активируют С-киназную ветвь кальциевой сигнальной системы и способствуют высвобождению Ca^{2+} из депо. Действительно, предсокращение кольцевых сегментов α_1 -адренориметиком ФЭ усиливало эффекты CORM-2 на электрические и сократительные свойства гладкомышечных сегментов аорты и мочеточника. Вероятно, это связано с особенностями влияния на С-киназную ветвь кальциевой регуляции параметров электрической и сократительной активности ГМК, а включение этого внутриклеточного пути передачи сигналов становится дополнительной мишенью для СО.

Блокирование калиевых каналов мембраны ГМК приводило к снижению миогенных эффектов СО, что указывает на участие калиевой проводимости мембраны в механизмах действия данного газомедиатора [10], главным образом, ее потенциал-зависимого компонента.

Направленность вазоактивных эффектов H_2S , как нами установлено, зависела от действующей концентрации сероводорода и особенностей фактора, вызвавшего сократительный ответ ГМК. И если на фоне активации рецептор-управляемого входа Ca^{2+} фенилэфрином донор H_2S (5–1000 мкМ) вызывал дозозависимое расслабление сосудистых ГМК, то при действии 30 мМ хлорида калия подобный эффект NaHS наблюдался в концентрациях свыше 100 мкМ. Действительно, буметанид-чувствительный компонент входа $^{86}\text{Rb}^+$ в изолированные сосудистые ГМК достоверно увеличивался в присутствии именно 50 и 100 мкМ NaHS . Блокирование калиевых каналов тетраэтиламмонием или 4-аминопиридином ослабляло вазорелаксирующее действие H_2S , подтверждая роль потенциал-зависимых калиевых каналов в эффектах H_2S , наряду с уже известными K_{ATP} -каналами [7].

В отличие от сосудистых, ГМК мочеточника реагировали на NaHS дозозависимым увеличением величин параметров электрической и сократительной активности, обусловленное, как предполагается, снижением цАМФ-зависимой регуляции калиевой проницаемости мембран ГМК [17,19]. Неоднозначность влияния различных концентраций H_2S на калиевую проводимость мембран клеток отразилась и в угнетении активности K_{Ca} -каналов мембран эритроцитов, стимулированных кальциевым ионофором A23187 или феназинметосульфатом.

Ингибирование $\text{Na}^+, \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ -котранспортера подтвердило участие градиентобразующего влияния ионов натрия на эффекты СО и H_2S . На фоне угнетения активности данного транспортера буметанидом влияние СО и NaHS на сокращения сосудистых сегментов аорты крысы и показатели электрической и сократительной активности ГМК мочеточника снижалось. Ранее нами было показано, что влияние на сократительную активность электронейтрального НКСС связано с обеспечением переноса ионов хлора (совместно с Na^+ и K^+) через мембрану внутрь клетки и поддержанием внутриклеточной концентрации ионов хлора в ГМК выше равновесной [20–22]. В результате повышения хлорной проводимости и деполяризации мембраны ГМК открываются дополнительные потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы L-типа, увеличивается внутриклеточная концентрация Ca^{2+} и сократительный ответ гладких мышц [18,23]. Это служит дополнительным указанием на то, что хлорные токи участвуют в регуляции сопряжения возбуждение–сокращение ГМК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внутриклеточная трансдукция сигналов, опосредованная газотрансмиттерами, наряду с «классическими» посредниками может выступать в качестве одного из претендентов на участие в регуляции функциональных свойств различных клеток, тканей и органов. Полученные результаты являются свидетельством того, что газовые посредники путем модулирования работы ион-транспортных систем, в частности, калиевых каналов и $\text{Na}^+, \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ -котранспортера способны оказывать свое влияние на механизмы электрогенеза и поддержания сокращения мышечных клеток.

Выяснение эффекторных мишеней действия газовых медиаторов и особенностей взаимодействия с ними имеет существенное значение не только с позиции получения фундаментального знания о принципах внутри- и межклеточной сигнализации, но также могут быть использованы при разработке молекулярных технологий управления поведением клеток путем модификации газовой коммуникации. Отдельного внимания заслуживает и вопрос о взаимовлиянии NO -, CO - и H_2S -зависимых сигнальных путей, пересечение которых на различных уровнях сигнальных каскадов может приводить как к их взаимному активированию, так и к ингибированию. Следствием этого будет являться изменение функционально значимых реакций со стороны отдельных клеток, органов и систем при различных физиологических и патологических состояниях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (соглашение №26 16-34-00419\16).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. В. Гусакова, И. В. Ковалев, Л. В. Смаглий и др., *Успехи физиол. наук* **46** (4), 53 (2015).
2. С. И. Колесников, Б. Я. Власов и Л. И. Колесникова, *Вестн. РАМН* **70** (2), 237 (2015).
3. Н. Н. Хаертдинов, Д. Р. Ахметшина, А. Л. Зефирова и Г.Ф. Ситдикова, *Биол. мембраны* **29** (4), 231 (2012).
4. E. Lowicka and J. Beltowski, *Pharmacol. Reports* **59**, 4 (2007).
5. S. H. Heinemann, T. Hoshi, M. Westerhausen, and A. Schiller, *Chem. Commun.* **50**, 3644 (2014).
6. L. Li, P. Rose, and P. K. Moore, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **51**, 169 (2011).
7. A. K. Mustafa, G. Sikka, S. K. Gazi, et al., *Circ. Res.* **109** (11), 1259 (2011).
8. Ch. W. Leffler, H. Parfenova, and J. H. Jaggar, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**, 1 (2011).
9. J. H. Jaggar, A. Li, H. Parfenova, et al., *Circ. Res.* **97** (8), 805 (2005).
10. C. Peers, M. L. Dallas, and J. L. Scragg, *Comm. Integ. Biol.* **2**, 241 (2009).
11. M. L. Dallas, J. L. Scragg, and C. Peers, *Adv. Exp. Med. Biol.* **648**, 89 (2009).
12. G. H. Liang, Q. Xi, Ch. W. Leffler, and J. H. Jaggar, *J. Physiol.* **590** (11), 2709 (2012).
13. R. Y. Zhang, Y. Sun, H. J. Tsai, et al., *PLoS One* **7** (5), Article ID e37073 (2012), <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0037073>.
14. F. Moccia, G. Bertoni, A. F. Pla, et al., *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12** (9), 1416 (2011).
15. W. Zhang, C. Xu, G. Yang, et al., *Oxid. Med. Cell. Long.* **2015** Article ID 323269 (2015), <http://dx.doi.org/10.1155/2015/323269>.
16. А. В. Ситожевский, И. В. Петрова, С. В. Кремено и др., *Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова* **92** (4), 461 (2006).
17. И. В. Ковалёв, М. Б. Баскаков, С. В. Гусакова и др., *Бюл. сибирской медицины* **11** (6), 51 (2012).
18. Л. В. Смаглий, С. В. Гусакова, Ю. Г. Бирулина и др., *Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова* **101** (4), 441 (2015).
19. J. J. Lim, Y. H. Liu, E. S. Win-Khin, et al., *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **295**, 1261 (2008).
20. А. А. Платонова, С. В. Кольцова, Г. В. Максимов и др., *Биофизика* **58** (3), 501 (2013).
21. S. N. Orlov, S. V. Koltsova, J. Tremblay, et al., *Ann. Med.* **44** (Suppl. 1), S111 (2012).
22. Y. J. Anfinogenova, M. B. Baskakov, I. V. Kovalev, et al., *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **449**, 42 (2004).
23. F. Akar, G. Jiang, R.J. Paul, and W. C. O'Neill, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **281**, 579 (2001).

The Effects of Carbon Monoxide and Hydrogen Sulfide on Transmembrane Ion Transport

S.V. Gusakova*, I.V. Kovalev*, Yu.G. Birulina*, L.V. Smagliy* **, I.V. Petrova*, A.V. Nosarev* **, A.N. Aleinyk**, and S.N. Orlov* ***

*Siberian State Medical University, Moskovskii Trakt 2, Tomsk, 634050 Russia

**Tomsk Polytechnic University, prosp. Lenina 2, Tomsk, 634050 Russia

***Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

We investigated the activity of electroneutral ion transport in response to the effect of gasotransmitters carbon monoxide and hydrogen sulfide. It was shown that the activator of receptor-regulated calcium intake in phenylephrine enhanced the relaxing action of carbon monoxide and hydrogen sulfide. Inhibition of the membrane potassium conductance, especially its voltage-dependent component, decreased myogenic effects of carbon monoxide in smooth muscles. Effects of hydrogen sulfide depended on the concentration and the method of activation of cell transport systems. Furthermore, a sodium-dependent component of the membrane conductivity is also involved in implementation of the effects of this gasotransmitter on ion transport system in addition to the calcium and potassium conductance. This expands the range of possible targets of signaling pathways mediated with gasotransmitters, which may either activate or inhibit cell functions. The results of such impact on functionally significant responses of cells, organs and systems should be taken into consideration in different physiological and pathological states.

Key words: carbon monoxide, hydrogen sulfide, potassium conductance of membrane, $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -cotransport, smooth muscle cells