

## ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКИХ МЫШЦ

Желудева А. С.

*ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России», Томск, Россия (634050, Томск, ул. Московский тракт, 2), e-mail: [zheludevan@rambler.ru](mailto:zheludevan@rambler.ru)*

---

С помощью механографии и радионуклидных методов исследовались механизмы действия монооксида углерода (СО) на сократительные реакции сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК).

Показано, что донор СО - CORM-2, в экспериментах с гиперкалиевой контрактурой в концентрациях 10-1000 мкМ, а в случаях предсокращения гладких мышц фенилэфрином (10 мкМ) от 1 мкМ и выше, дозозависимо расслаблял сосудистые сегменты. Ингибиторы NO-синтазы и растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) ослабляли СО-индуцированную релаксацию сегментов. CORM-2 достоверно уменьшал никардипин-чувствительный вход  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в свежевыделенные гладкомышечные клетки аорты. Дозозависимое расслабляющее действие СО обусловлено открыванием потенциал-зависимых и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов и уменьшением входа  $\text{Ca}^{2+}$  по потенциал-зависимым  $\text{Ca}^{2+}$ -каналам L-типа сосудистых гладкомышечных клеток. Впервые установлено вовлечение потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа в механизмы расслабляющего действия СО.

---

Ключевые слова: сосудистые гладкомышечные клетки, газотрансмиттеры, монооксид углерода.

## IONIC MECHANISMS OF CARBON MONOXIDE ON CONTRACTILE ACTIVITY OF VASCULAR SMOOTH MUSCLES

Zheludeva A. S.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia (634050, Tomsk, street Moskovsky trakt, 2), e-mail: [zheludevan@rambler.ru](mailto:zheludevan@rambler.ru)

---

Using methods of mechanography and radionuclide techniques we investigated the mechanism of carbon monoxide (CO) action on the contractile responses of vascular smooth muscle cells (SGMK).

It was shown that the donor CO - CORM-2 in concentrations of 10-1000  $\mu\text{M}$  in the case of high potassium contractions, and in concentrations of 1  $\mu\text{M}$  and above in the case of phenylefrine-induced contractions (10  $\mu\text{M}$ ) of smooth muscles caused a dose-dependent relaxation of vascular segments. Inhibitors of NO-synthase and soluble guanylate cyclase (GC) weakened CO - induced relaxation of the segments. CORM-2 significantly decreased nicardipine-sensitive input of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  in freshly isolated aortic smooth muscle cells. Dose-dependent relaxation of the CO is caused by opening of voltage-dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels and by decreasing of  $\text{Ca}^{2+}$  entry through L-type of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels of vascular smooth muscle cells.

For the first time we established the involvement of L-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mechanisms of relaxing action of CO.

---

Key words: vascular smooth muscle cells, gasotransmitters, carbon monoxide.

**Введение.** Монооксид углерода (СО) является представителем так называемых газотрансмиттеров и позиционируется как внутриклеточная сигнальная молекула. Многочисленными исследованиями документирован один из основных физиологических эффектов СО – способность вызывать расслабление артериальных сосудов. Вовлекая различные клеточные и молекулярные каскады, оксид углерода индуцирует вазодилатацию

[5, 8, 9]. Эти данные позволяют рассматривать СО как один из факторов, препятствующих локальному вазоспазму и увеличению сосудистого тонуса.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что расслабление сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК) при действии монооксида углерода опосредовано циклическим ГМФ и ковалентной модификацией кальций-активируемых  $K^+$ -каналов большой проводимости (ВК(Са)) [5]. В последние годы более предпочтительной считается гипотеза о прямом действии СО на ВК(Са)-каналы. Допускается, что  $\alpha$ -субъединица ВК(Са)-канала содержит гем-связывающий карман, и ассоциация последнего блокирует этот канал. СО взаимодействует с канал-связанным железом гема и нарушает связь гема с каналом, тем самым приводя к его активации. Таким образом, с этих позиций, ВК(Са)-канал функционально является гемопротеином. Связанный с каналом гем служит рецептором для СО, и ассоциация монооксида углерода с последним повышает чувствительность канала к  $Ca^{2+}$ . В ГМК ВК(Са)-каналы активируются локальными транзиторными повышениями концентрации  $Ca^{2+}$ . Поскольку подавление осцилляций кальция или блокирование ВК(Са)-каналов устраняет индуцированное монооксидом углерода расслабление сосудистых гладких мышц, считается, что сопряжение кальциевых всплесков с ВК(Са)-каналом является ключевым звеном в обеспечении релаксирующего действия СО [7]. Активация ВК(Са)-канала, в свою очередь, ведет к гиперполяризации мембраны СГМК, закрыванию потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$  каналов и уменьшению входа  $Ca^{2+}$  в клетки. [2].

Существенно меньше известно действие монооксида углерода на другие пути транспорта ионов в СГМК. В этой работе мы исследовали действие донора СО на сокращения изолированных сегментов аорты крыс и внутрь направленный транспорт  $Ca^{2+}$  в свежeweделенные ГМК из аорты крысы.

**Материалы и методы.** Исследование сократительной активности гладкомышечных сегментов проводилось с использованием сертифицированной четырехканальной механографической установки Myobath II и аппаратно-программного комплекса LAB-TRAX-4/16 (Германия). Объектом исследования явились изолированные сегменты грудного отдела аорты беспородных белых крыс, которые являются традиционной моделью артериального сосуда мышечного типа. После выделения аорту помещали в физиологически сбалансированный солевой раствор Krebsa, с помощью хирургических ножниц отпрепаровывали жировую и соединительную ткань и выделяли сегменты шириной 2–3 мм. Эндотелий удаляли механически, вращением деревянного манипулятора в просвете сегмента в течение 1 минуты непосредственно перед выполнением эксперимента. Сосудистые сегменты предварительно растягивали нагрузкой 500 мг и фиксировали с помощью стальных

крючков в термостатируемой камере объемом 10 мл. Измерения механического напряжения гладкомышечных препаратов производилось в изометрическом режиме.

Амплитуду контрольных (100 %) сократительных ответов сосудистых сегментов на действие гиперкалиевого раствора (эквимолярное замещение 30 мМ NaCl на KCl) или 10 мкМ фенилэфрина (ФЭ) регистрировали после 40–50 минут выдерживания в нормальном растворе Кребса.

Растворы для перфузии препаратов готовились на основе дистиллированной воды добавлением соответствующих реактивов (ХЧ, «Реахим», Россия). Физиологический раствор Кребса содержал (в мМ): 120.4 NaCl, 5.9 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 5.5 глюкозы, 15 C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N [tris(oxymethyl)-aminometan] (316.4 мосМ). В растворах поддерживались значения pH 7,35–7,40 и температуры 37,0 ± 0,1 °С.

Измерения входящих потоков ионов проводили на свежeweделенных СГМК аорты крысы и использовали в 3–8 пассажах, которые приобретали у Lonza (Walkersville, MD, США). Активность потенциал-зависимых Ca<sup>2+</sup> каналов L-типа оценивалась как никардипин-чувствительный компонент скорости входа <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> [7]. В части образцов инкубационная среда содержала 1 мкМ никардипина. Через 10 мин инкубации при 37 °С поглощение изотопа было инициировано добавлением гиперкалиевой среды (20 мМ NaCl, 125 мМ KCl), содержащий 3 мкС / мл <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>. Через 5 мин поглощение изотопа была прекращено путем добавления ледяной среды. Радиоактивность инкубационной среды и клеточного лизата определяли на жидкостном сцинтилляционном анализаторе. Скорость входа <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> (V, нмоль на мг белка за 5 мин.) была рассчитана как  $V = A/am$ , где A-радиоактивность образцов (срм), а - специфическая радиоактивность <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> в среде (срм/нмоль) и m – содержание белка.

Реактивы и статистика. <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> Perkin Elmer (Waltman, MA, USA). Остальные химические вещества были получены от Sigma (St. Louis, Миссури, США). Tricarbonyldichlororuthenium(II)-dimer (CORM-2) (Sigma); 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) (Sigma); NG-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) (Sigma); Phenylephrine hydrochloride (Sigma). Никардипин растворяли в 70 % этаноле. Этанол до конечной концентрации 0,1 % не влиял на измеряемые показатели. Анализ данных проводили при помощи программы Statistica 6.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде «среднее ± ошибка среднего» (X±m). Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий нормальности Колмогорова-Смирнова. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Для проверки однородности парных или зависимых, выборок был использован T-критерий Вилкоксона (Wilcoxon mached pairs test). Достоверность различий определялась при p < 0,05.

**Результаты и обсуждение.** В качестве донора монооксида углерода использовался tricarbonyldichlororuthenium(II)-dimer (CORM-2) [8]. В концентрациях 1–1000 мкМ CORM-2 не влиял на исходное механическое напряжение (МН) исследуемых препаратов, но дозозависимо расслаблял сосудистые сегменты, предсокращенные деполяризацией мембраны в гиперкалиевом растворе (30 мМ КСl) или действием ФЭ (10 мкМ).

Концентрация CORM-2, вызывающая полумаксимальное уменьшение величины МН ( $EC_{50}$ ) сегментов аорты, вызванного действием гиперкалиевого раствора, равнялась 100 мкМ ( $58.4 \pm 6.7\%$ ,  $n=6$ ,  $p < 0.05$ ), а  $EC_{50}$  CORM-2 при предсокращении, индуцированном ФЭ (10 мкМ) - ( $59.7 \pm 4.8\%$ ,  $n=6$ ,  $p < 0.05$ ).

Известно, что расслабляющее действие СО на ГМК в значительной степени обусловлено активацией растворимой гуанилатциклазы (рГЦ), которая также является главной мишенью для оксида азота (NO), и расслабляющее действие обоих газов на сосудистые ГМ в значительной степени также обусловлено увеличением внутриклеточной концентрации цГМФ. Для исследования роли цГМФ и NO в механизмах действия монооксида углерода на сосудистые сегменты использовали ингибитор рГЦ - 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) [3] и  $N^G$ -нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) [4], соответственно. Тестировалось действие CORM-2 в концентрациях, равных  $EC_{50}$  для обоих способов предсокращения гладкомышечных сегментов.

Использованные ингибиторы ферментов не влияли на исходное МН сосудистых сегментов и амплитуду сокращений, вызванных действием гиперкалиевого раствора и ФЭ, но достоверно снижали расслабляющее действие CORM-2 на сегменты, предсокращенные действием последних (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что, во-первых, релаксирующее действие СО на сосудистые сегменты, по крайней мере, частично, опосредовано активацией рГЦ, которая считается основной мишенью и для NO, во-вторых, являются указанием на то, что одним из молекулярных каскадов, используемых СО для реализации своего действия на СГМК, является цГМФ.

Для исследования взаимодействия оксидов азота и углерода в процессе трансляции сигнала, индуцированного СО эндогенный синтез оксида азота выключался ингибитром NO-синтазы  $N^G$ -нитро-L-аргинин метиловым эфиром (L-NAME).

В концентрации 100 мкМ L-NAME не влиял на исходное МН гладкомышечных сегментов аорты, а также амплитуду сокращений, вызванных деполяризацией мембраны при действии гиперкалиевого раствора и ФЭ, но достоверно ослаблял расслабляющее действие CORM-2 на предсокращенные сосудистые сегменты.

После предобработки сосудистых препаратов L-NAME, расслабляющее действие CORM-2 на гладкомышечные сегменты, предсокращенные в гиперкалиевом растворе или ФЭ, резко уменьшалось (табл. 1).

Следовательно, в условиях угнетения синтеза оксида азота, релаксирующий эффект донора СО достоверно ослаблялся. Полученные данные являются указанием на то, что одним из молекулярных каскадов, используемых СО для реализации своего действия на СГМК, является оксид азота. Имеются основания полагать, что основой синергизма газотрансмиттеров является сенсбилизация оксидом азота рГЦ к действию СО.

В другой серии экспериментов исследовалось влияние монооксида углерода на кальциевую проводимость мембраны исследуемых СГМК. Маркером оперирования потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$  каналов L-типа служил никардипин-чувствительный вход  $^{45}Ca^{2+}$  в изолированные СГМК аорты крысы. Мы исследовали влияние CORM-2 на этот компонент входящего  $Ca^{2+}$  тока. Документировано, что CORM-2 дозозависимо уменьшал никардипин-чувствительный вход  $^{45}Ca^{2+}$  в исследуемые клетки (табл. 2).

Таблица 1

**Влияние ингибиторов ферментов на эффекты CORM-2 в гладких мышцах аорты, предсокращенных гиперкалиевым раствором (А) и фенилэфрином (Б)**

А) Добавки	Механического напряжения, %	Б) Добавки	Механического напряжения, %
Контроль (30 мМ КСl)	100	Контроль (ФЭ $10^{-5}$ )	100
30 мМ КСl + CORM-2 (100 мкМ)	58,4±6,7 (*)	ФЭ ( $10^{-5}$ ) + CORM-2 (10 мкМ)	59,7±4,8 (*)
30 мМ КСl + CORM-2 (100 мкМ) + L-NAME (100 мкМ)	88,7±5,6 (*)	ФЭ ( $10^{-5}$ ) + CORM-2 (10 мкМ) + L-NAME (100 мкМ)	89,8 ± 4,3 (*)
30 мМ КСl + CORM-2 (100 мкМ) + ODQ (1 мкМ)	79,3 ± 3,0 (*)	ФЭ ( $10^{-5}$ ) + CORM-2 (10 мкМ) + ODQ (1 мкМ)	84,6 ± 4,5 (*)

X±m, полученные в 6 независимых экспериментах.

Величина механического напряжения сосудистых сегментов в отсутствии CORM-2 принята за 100 %.

\* –  $p < 0.05$  в сравнении с контролем.

**Дозозависимое действие донора СО - CORM-2 на вход  $Ca^{2+}$  в гладкомышечные клетки аорты крысы**

Добавки, мкМ	L-тип $Ca^{2+}$ Каналов, %	Никардипин-резистентный вход $Ca^{2+}$ , %
Нет (контроль)	100	100
CORM-2, 5	92±7	108±5
CORM-2, 10	103±9	89±12
CORM-2, 50	85±7	108±10
CORM-2, 100	72±6*	102±9
CORM-2, 500	64±5**	97±7

$X \pm m$ , полученные в 3 независимых экспериментах, выполненных в четырех пробах. Активность L-типа  $Ca^{2+}$  каналов и систем, обеспечивающих никардипин-резистентный вход  $Ca^{2+}$  в отсутствие CORM-2, принята за 100 % \*;

\*\* –  $p < 0.05$  и  $0,002$  в сравнении с контролем, соответственно.

Следовательно, приведенные результаты исследований указывают на наличие в СГМК еще одной мишени для монооксида углерода. В самом деле, дозозависимое уменьшение CORM-2 никардипин-чувствительного входа  $Ca^{2+}$  свидетельствует в пользу предположения о том, что потенциал-зависимые  $Ca^{2+}$  каналы L-типа вовлечены в механизмы расслабляющего действия СО на гладкомышечные сегменты аорты крысы. Вместе с тем, в данных исследованиях мы не можем исключить, что уменьшение никардипин-чувствительного входа  $^{45}Ca^{2+}$  в СГМК аорты крысы связано с блокирующим действием комплексов рутения (Ru (II) на эти каналы. Уточнение данного вопроса имеет принципиальное значение и необходимо проведение дополнительных экспериментов.

**Список литературы**

1. Баскаков М. Б. Газовая атака или Осторожно, газы! / М. Б. Баскаков, М. С. Юсубов // Бюллетень Сибирской медицины. – 2010. – Т. 9. – № 6. – С. 160–164.
2. Anfinogenova Y. J. Baskakov M. B., Kovalev I. V., Kilin A. A., Dulin N., Orlov S. N. 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. – P. 42–55.
3. Jaggar J. H. 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.

4. Leffler C. W. Parfenova H., Jaggar J. H., Wang R. Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation / C. W. Leffler, H. Parfenova, J. H. Jaggar et al. // J Appl Physiol. – 2006. – Vol. 100. – P. 1065–1076.
5. Lim I. Carbon monoxide activates human intestinal smooth muscle L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels through a nitric oxide-dependent mechanism / I. Lim, S. J. Gibbons, G. L. Lyford et al. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. – 2005. – Vol. 288. – № 1. – P. 7–14.
6. Orlov S. N. Cell volume in vascular smooth muscle is regulated by bumetanide-sensitive ion transport / S. N. Orlov, J. Tremblay, P. Hamet // Am J Physiol. – 1996. – Vol. 270. – P. 1388–1397.
7. Orlov S. N. CAMP signaling inhibits dihydropyridine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  influx in vascular smooth muscle cells / S. N. Orlov, J. Tremblay, P. Hamet // Hypertension. – 1996. Vol. 27. – P. 774–780.
8. Tschugguel W. Estrogen increases endothelial carbon monoxide, heme oxygenase 2 and carbon monoxide-derived cGMP by a receptor mediated system / W. Tschugguel, F. Stonek Z. Zhegu et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2001. – Vol. 86. – P. 3833–3839.
9. Xi Q. Carbon monoxide activates K $\text{Ca}$  channels in newborn arteriole smooth muscle cells by increasing apparent  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of alpha-subunits / Q. Xi, D. Tcheranova, H. Parfenova et al. // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2004. – Vol. 286. – № 2. – P. 610–618.

*Исследование выполнено при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № 14.740.11.0932, № 16.512.11.2282, соглашение № 8487).*

**Рецензенты:**

Носарев Алексей Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России, г. Томск.

Капилевич Леонид Владимирович, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины, ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск.