УДК 546.221.1:612.822:616
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-91-99

А. В. МУРАВЬЕВ

Роль газовых медиаторов (CO, NO и H_2S) в регуляции кровообращения: анализ участия микрореологии клеток крови

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет имени К. Д. Ушинского», г. Ярославль, Россия
150000, г. Ярославль, ул. Республиканская, д. 108/1
E-mail: alexei.47@mail.ru

Статья поступила в редакцию 06.12.20; принята к печати 22.01.21

Резюме

Среди сигнальных молекул, участвующих в регуляции внутри- и межклеточных систем в различных типах клеток, особое место занимают газообразные соединения – газотрансмиттеры (ГТ). В настоящее время наиболее изученными являются три молекулы: оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сероводород (H_2S). Для них определены ферментативные системы внутриклеточного синтеза и деградации, доказано физиологическое действие и определены внутриклеточные механизмы, изменение работы которых под влиянием ГТ вызывает развитие физиологических и/или патофизиологических реакций. Эти ГТ участвуют в регуляции различных органов и систем организма человека в норме и при патологии и, в том числе, структуры и функции системы кровообращения. В данной статье особое внимание уделено влиянию всех трех газотрансмиттеров и их доноров на сосудистый и гемореологический аспект кровообращения и особенно на малоразработанную проблему – микрореологию эритроцитов. Показано, что все три ГТ, наряду с известным вазодилатирующим эффектом, снижают адгезию и агрегацию тромбоцитов и лейкоцитов, а также умеренно стимулируют деформируемость эритроцитов и выражено угнетают их агрегацию. Выполненный анализ данных свидетельствует о том, что, наряду с особенными сигнальными каскадами, для каждого ГТ в микрореологических ответах может быть использован общий сигнальный путь, ассоциированный с растворимой гуанилатциклазой и NO-синтазой. Пересечение сигнальных путей запускаемых NO, CO и H_2S на общих эффекторах, а также взаимодействие их между собой (cross-talk) может определять конечный, результирующий функциональный ответ клетки.

***Ключевые слова**: газотрансмиттеры, оксид азота, сероводород, монооксид углерода, кровообращение, микрореология, эритроциты*

Для цитирования: *Муравьев А. В. Роль газовых медиаторов (CO, NO и H_2S) в регуляции кровообращения: анализ участия микрореологии клеток крови. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):91–99. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-91-99.*

UDK 546.221.1:612.822:616
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-91-99

A. V. MURAVYOV

The role of gaseous mediators (CO, NO and H_2S) in the regulation of blood circulation: analysis of the participation of blood cell microrheology

Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia
108/1, Respublikanskaya str., Yaroslavl, Russia, 150000
E-mail: alexei.47@mail.ru

Received 06.12.20; accepted 22.01.21

Summary

Among the signaling molecules involved in the regulation of intra- and intercellular systems in various types of cells, a special place is occupied by gaseous compounds – gasotransmitters (GTs). Currently, the most studied are three molecules: nitrogen oxide (NO), carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H2S). For them, the enzymatic systems of intracellular synthesis and degradation have been determined, the physiological effect has been proved, and the intracellular mechanisms have been determined. Changes in the work of these mechanisms under the influence of GTs causes the development of physiological and/or pathophysiological reactions. These GTs are involved in the regulation of various organs and systems of the human body under normal and pathological conditions, including the structure and function of the circulatory system. In this article, special attention is paid to the influence of all three GTs and their donors on the vascular and hemorheological aspect of the work of blood circulation, and especially on an underdeveloped problem – the microrheology of erythrocytes. It has been shown that all three GTs, along with the well-known vasodilating effect, reduce the adhesion and aggregation of platelets and leukocytes, as well as moderately stimulate the deformability of erythrocytes and strongly inhibit their aggregation. The performed analysis of the data indicates that, along with the specific signaling cascades for each GT, the use of a common signaling pathway associated with soluble guanylate cyclase and NO synthase was also revealed in microrheological responses. The intersection of signaling pathways triggered by NO, CO and H2S on common effectors, as well as their interaction with each other (cross-talk), can determine the final, resulting functional response of the cell.

***Keywords:** gasotransmitters, nitric oxide, hydrogen sulfide, carbon monoxide, blood circulation, microrheology, erythrocytes*

For citation: *Muravyov A. V. The role of gaseous mediators (CO, NO and H_2S) in the regulation of blood circulation: analysis of the participation of blood cell microrheology. Regional blood circulation and microcirculation. 2021;20(1):91–99. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-91-99.*

Введение

В передаче регуляторных сигналов к эффекторным клеткам, наряду с синаптической формой, используется и другой способ межклеточной и внутриклеточной коммуникации – передача информации с помощью газовых медиаторов, или газотрансмиттеров (ГТ). К ним относятся оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сульфид водорода (H_2S) [1–3].

Все три указанных газа соответствуют всем критериям, определяющим их как газовые медиаторы или трансмиттеры. Термин «газотрансмиттер» относится к газообразной молекуле, которая синтезируется и высвобождается в биологической системе и обладает функцией преобразования сигнала. Ниже приведены критерии идентификации для газотрансмиттера. Соединение должно [4]:

1) быть газом;

2) быть эндогенно и ферментативно вырабатываемым регулируемым образом;

3) вызывать, при экзогенном применении, четко определенные физиологические эффекты в соответствующих концентрациях, которые имитируют действие эндогенно продуцируемого ГТ на клетки тканей;

4) действовать на определенные клеточные мишени;

5) использовать особый механизм инактивации.

В течение многих десятилетий оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода описывались как токсичные газы, оказывающие повреждающее действие на организм человека. Вместе с тем относительно недавно было установлено, что указанные выше соединения эндогенно синтезируются клетками организма и являются сигнальными молекулами, выполняющими как аутокринную, так и паракринную регуляцию во многих тканях и органах тела человека и животных [5]. Изучение действия механизмов газовых трансмиттеров – важная задача современной физиологии.

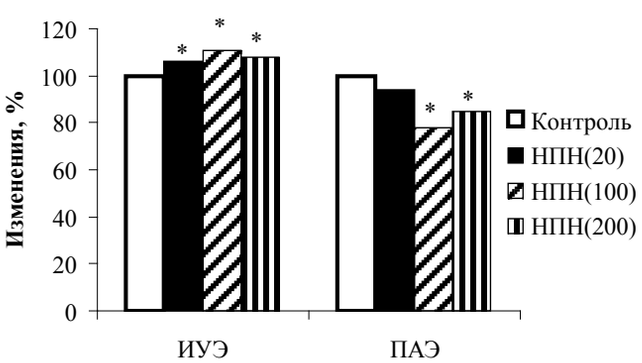

Рис. 1. Изменение деформируемости (ИУЭ) и агрегации эритроцитов (ПАЭ) после их инкубации с нитропруссидом натрия (НПН): ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов как показатель их деформируемости; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов; концентрации НПН (мкМ) указаны в скобках; * – отличие от контроля статистически достоверно ($p<0,05$)

Fig. 1. Change in deformability (IEE) and aggregation of erythrocytes (IAE) after their incubation with sodium nitroprusside (SNP): IEE is an index of elongation of erythrocytes as an indicator of their deformability; IAE is an indicator of aggregation of erythrocytes; SNP concentrations (μM) are indicated in brackets.; * – the difference from the control is statistically significant ($p<0.05$)

Объектом регуляторного воздействия являются и клеточные структуры системы кровообращения. Известно, что артериальное давление и перфузия тканей в значительной мере регулируются артериолами, сосудами, расположенными непосредственно перед нутритивными капиллярами. Они известны как резистивные сосуды и составляют обширную сеть. Для поддержания перфузии адекватной запросу тканей эти сосуды реагирует на эндокринные, паракринные и аутокринные сигналы. Паракринные регуляторные воздействия и, в том числе, газотрансмиттеры, расширяют мелкие артерии и артериолы и тем самым обеспечивают эффективную тканевую перфузию [2]. Известно, что все они стимулируют образование циклических нуклеотидов (цАМФ/цГМФ) и активируют внутриклеточные протеинкиназы (PKA/PKG). Сигнальный молекулярный путь этих газотрансмиттеров может включать регуляцию калиевых каналов, что также вызывает вазодилатацию. Кроме того, показано, что вазорелаксация в ответ на действие H_2S возникает в результате активации АТФ-зависимых калиевых каналов ($K^+_{АТР}$), а также потенциалзависимых калиевых каналов [6]. Что касается монооксида углерода, то его сосудорасширяющий эффект может быть связан с активацией кальцийзависимых калиевых каналов [7]. При этом необходимо заметить, что активация PKG или PKA, с помощью NO, также приводит к открытию этих каналов.

Таким образом, можно полагать, что все три газотрансмиттера участвуют в регуляции кровообращения, включая сосудистый компонент, а также и текущую по сосудам кровь, управляя ее текучестью и транспортным потенциалом через регуляторное воздействие на микрореологию ее клеток и, особенно, эритроцитов.

Роль оксид азота в регуляции кровообращения и микрореологии клеток крови

Среди трех упомянутых выше газовых медиаторов первым был описан оксид азота. NO служит ключевым вторичным мессенджером в животном мире позвоночных и играет важную роль в межклеточной и внутриклеточной трансдукции регуляторных сигналов [8]. Эта молекула является одним из наиболее важных элементов внутриклеточных сигнальных каскадов в сосудистой системе [9, 10]. Оксид азота был впервые описан как биоактивная молекула благодаря его способности стимулировать растворимую гуанилатциклазу (р-ГЦ) [11, 12]. Исследования, проведенные за последние 30 лет, показали значительное разнообразие передачи сигналов с помощью NO в сосудистой системе, которое включает, кроме активации р-ГЦ, также и S-нитрозирования белков [13].

Важную роль в NO-сигнальных каскадах играет эндотелиальная NO-синтаза (eNOS). Этот фермент обеспечивает синтез бóльшей части NO и является кальцийзависимым ферментом [14]. Выделяют три основные изоформы NO-синтаз: нейрональную, макрофагальную и эндотелиальную. Главным источником синтеза NO в организме служит аминокислота L-аргинин.

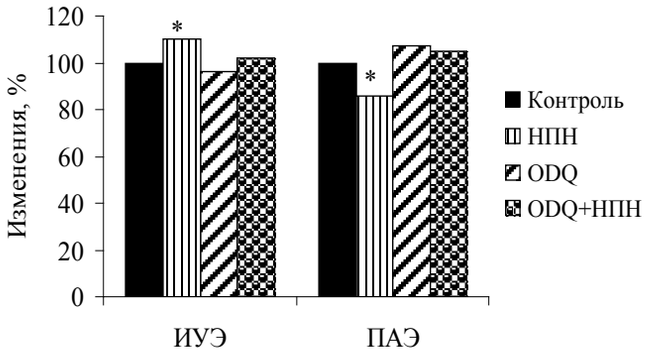

Рис. 2. Изменение деформируемости (ИУЭ) и агрегации эритроцитов (ПАЭ) после их инкубации с нитропруссидом натрия (НПН), ODQ и их сочетанным воздействием (НПН+ ODQ): * – отличие от контроля статистически достоверно (p<0,05)

Fig. 2. Change in deformability (IEE) and aggregation of erythrocytes (IAE) after their incubation with sodium nitroprusside (SNP), ODQ and their combined effects (SNP + ODQ): * – the difference from the control is statistically significant (p<0.05)

Рис. 3. Схема распределения влияний оксида азота на сосуды и реологию крови

Fig. 3. Scheme of distribution of the effects of nitric oxide on blood vessels and blood rheology

Таким образом, можно заключить, что функция оксида азота как газотрансмиттера в регуляторных изменениях тонуса артериол и микрососудистой перфузии основательно изучена [3, 15]. Важно заметить, что в сосудистой системе только просвет сосуда (сосудистый тонус) может быть объектом регуляторных воздействий сигнальных молекул [16]. Тогда как гемореологический компонент располагает более широким спектром регуляторных ответов: 1) изменение вязкости плазмы и гематокрита создает на сосудистом эндотелии необходимую величину напряжения сдвига для продукции эндотелиальными клетками NO [17]; 2) в капиллярах, лишенных мышечных элементов, оптимизация тканевой перфузии возможна при положительных изменениях деформируемости эритроцитов; 3) в условиях гипоксии или механического напряжения на мембране эритроцитов происходит выделение АТФ. Это соединение используется эндотелиальными клетками в качестве сигнальной молекулы для образования NO и последующей релаксации гладкомышечных клеток, ведущей к вазодилатации [18]; 4) эритроциты, при оптимальной деформируемости, могут более эффективно транспортировать NO, а наличие собственной NO-синтазы в активной форме позволяет генерировать этот ГТ [19, 20]. В работе P. Ulker et al. [21] подтверждается гипотеза о том, что NOS в эритроцитах активна и экспорт NO из RBC усиливается механическим напряжением сдвига на мембране клетки.

При инкубации эритроцитов с донором оксида азота, с нитропруссидом (НПН) было показано умеренное увеличение (на 8–10 %, p<0,05) их деформируемости и выраженное снижение агрегации, при этом выявляется дозозависимый эффект (рис. 1).

Следовательно, инкубация эритроцитов с донорами оксида азота или со стимулятором NOS (L-аргинин) приводит к положительным изменениям микрореологии эритроцитов [22, 23]. Что касается клеточной молекулярной мишени для NO в эритроцитах, то было установлено, что после ингибирования р-ГЦ с помощью 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 0,5 мкМ) микрореологические ответы на НПН практически полностью устранялись (рис. 2). Показано, что ODQ ингибирует гем-содержащие ферменты – NO-синтазу и цитохромы Р-450, катализирующие образование NO из НПН [24].

Следовательно, в системе кровообращения роль NO заключается в регулировании кровяного давления и сосудистого тонуса, повышении деформируемости эритроцитов, ингибировании агрегации эритроцитов, тромбоцитов и адгезии лейкоцитов [23, 25]. Сниженная биодоступность NO считается одним из основных факторов сердечно-сосудистых заболеваний [26]. Экзогенные доноры NO и вещества, стимулирующие внутриклеточную NO-синтазу, широко используются в клинической практике и служат основой для разработки новых поколений лекарственных препаратов на основе метаболизма NO [27].

Таким образом, можно заключить, что оксид азота регулирует тканевую перфузию и доставку кислорода в клеточный микрорайон по двум направлениям:

1) дилатация артериол;

2) изменение реологии крови и микрореологических характеристик ее клеток и, главным образом, деформируемости и агрегации эритроцитов.

При этом важно заметить, что сосуды в ответ на NO имеют только один вариант изменений – вазодилата-

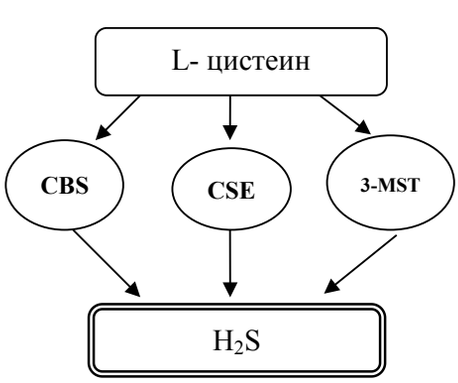

Рис. 4. Пути биосинтеза эндогенного сероводорода (H_2S): CBS – цистатионин-β-синтаза; CSE – цистатионин-γ-лиаза; 3-MST – 3-меркаптопируват серотрансфераза

Fig. 4. Ways of biosynthesis of endogenous hydrogen sulfide (H_2S): CBS – cystathionine-β-synthase; CSE – cystathionine-γ-lyase; 3-MST – 3-mercaptopyruvate serotransferase

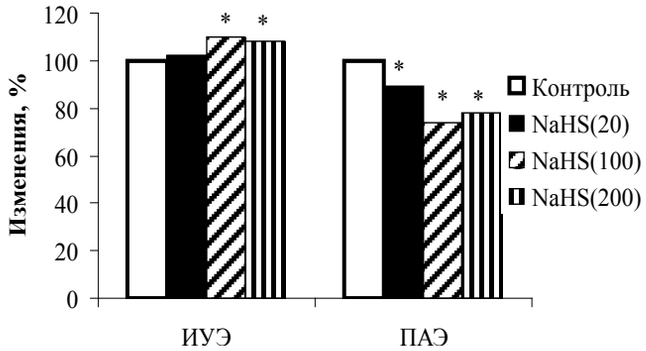

Рис. 5. Изменение деформируемости (ИУЭ) и агрегации эритроцитов (ПАЭ) после их инкубации с гидросульфидом натрия (NaHS) в трех концентрациях: NaHS (20) – концентрация 20 мкМ; NaHS (100) – концентрация 100 мкМ; NaHS (200) – концентрация 200 мкМ; * – отличие от контроля статистически достоверно при p<0,05

Fig. 5. Change in deformability (IEE) and aggregation of erythrocytes (IAE) after their incubation with sodium hydrosulfide (NaHS) in three concentrations: NaHS (20) – concentration 20 μM; NaHS (100) – concentration 100 μM; NaHS (200) – concentration 200 μM; * – the difference from the control is statistically significant at p<0.05

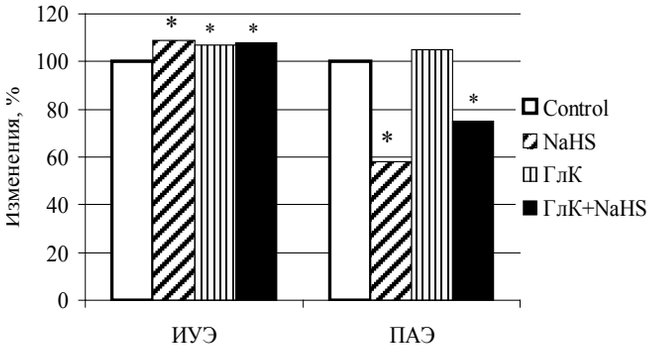

Рис. 6. Изменение деформируемости (ИУЭ) и агрегации эритроцитов (ПАЭ) под влиянием донора сероводорода NaHS и его сочетания с блокатором K+АТФ- каналов глибенклами-дом (ГлК, 50 мкМ): * – отличие от контроля статистически достоверно при p<0,05

Fig. 6. Change in deformability (IEE) and aggregation of erythrocytes (IAE) under the influence of the hydrogen sulfide donor NaHS and its combination with the blocker of K+ATP-channels glibenclamide (GlK, 50 μM): * – the difference from the control is statistically significant at p<0.05

цию. Тогда как в крови этот ГТ создает более сложную композицию регуляторных ответов, которые включают повышение деформируемости эритроцитов, выраженное снижение их агрегации, а это ведет к приросту скоростей сдвига и формированию бóльшего напряжения сдвига на эндотелии сосудов. Последнее является стимулом образования новых количеств NO (рис. 3).

Кроме того, снижение агрегации и адгезии лейкоцитов и тромбоцитов в этих условиях способствует повышению эффективности капиллярной перфузии. Прирост деформируемости эритроцитов сочетается с бóльшим выходом из них АТФ, обладающей вазодилатирущим эффектом. Существенное снижение агрегации эритроцитов под влиянием NO ведет к уменьшению вязкости крови при низких скоростях сдвига, что характерно для венул и вен, и тем самым способствует приросту текучести крови в этом важном отделе системы кровообращения, где формируется оптимальный диастолический объем сердца на основе эффективного венозного возврата.

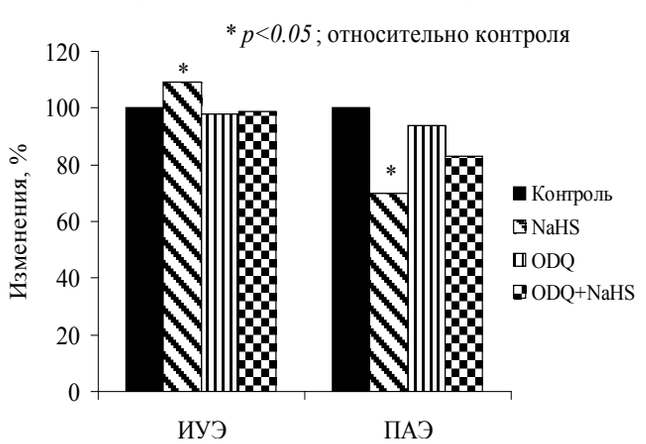

Рис. 7. Изменения деформируемости и агрегации эритроцитов под влиянием донора сульфида водорода после ингибирования р-ГЦ с помощью ODQ: * – отличие от контроля статистически достоверно при p<0,05

Fig. 7. Changes in deformability and aggregation of erythrocytes under the influence of the hydrogen sulfide donor after inhibition of s-GC using ODQ: * – the difference from the control is statistically significant at p<0.05

Роль сероводорода в регуляции кровообращения и микрореологии клеток крови

Сероводород (H_2S) известен как токсичный газ с запахом, напоминающим запах тухлых яиц. Это важный компонент в происхождении жизни, и он продолжает оставаться критически важным для жизни на нашей планете. Это бесцветный газ, хорошо растворимый в воде. H_2S проницаем для плазматических мембран, так как его растворимость в липофильных растворителях в 5 раз выше, чем в воде. Следовательно, газ может легко диффундировать через клетки и достигать внутриклеточных компартментов [28].

Биосинтез H_2S наблюдается в клетках современных животных и растений, а также у прокариот и грибов. Такие ферменты, как цистатионин-γ-синтаза (CGS) и цистатионин-β-лиаза (CBL), а также 3-меркаптопируват серотрансфераза (3-MST), участвуют в этом процессе (рис. 4):

1) CBS – цистатионин-β синтаза;
2) CSE – цистатионин-γ-лиаза;
3) 3-MST – 3-меркаптопируват серотрансфераза.

Все три фермента используют L-цистеин для образования сульфида водорода [29]. В процессе метаболизма H_2S окисляется до сульфита в митохондриях при помощи фермента тиосульфат-редуктазы [30]. Сигнальная роль H_2S главным образом связана с его способностью модифицировать различные белковые мишени, в частности, путем персульфидирования белковых остатков цистеина и взаимодействием с металлическими центрами, главным образом геммами [31]. Было показано, что H_2S регулирует множество клеточных процессов и, в том числе, играет существенную роль как сигнальная молекула в функционировании сердечно-сосудистой системы [32–34].

H_2S эндогенно генерируется в клетках гладких мышц (ГМК) сосудов, при этом в экспериментальных условиях он индуцирует зависимое от концентрации расслабление тканей аорты крысы, на которое не влияла денервация сосудов [35]. Аналогичным образом ингибирование e-NOS или блокада K(Ca)-каналов снижали вызванную H_2S релаксацию ткани аорты

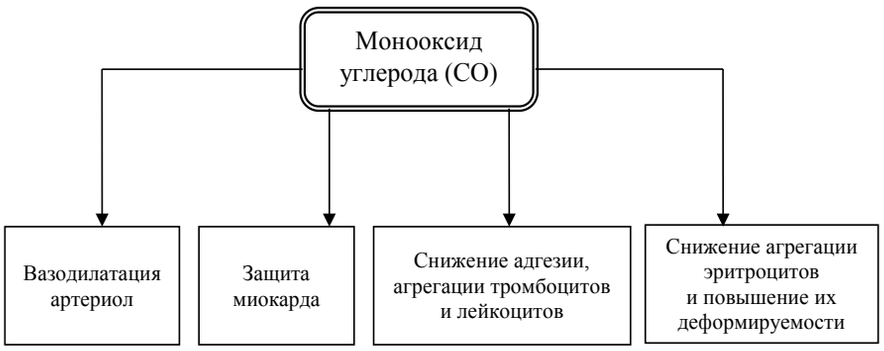

Рис. 8. Эффекты монооксида углерода как сигнальной молекулы в микроциркуляции и гемореологии

Fig. 8. Effects of carbon monoxide as a signaling molecule in microcirculation and hemorheology

с интактным эндотелием. Важно заметить, что релаксация, вызванная нитропруссидом натрия (НПН), полностью устранялась ODQ – ингибитором р-ГЦ. Однако в этих условиях ингибирование р-ГЦ усиливало вызванную H_2S вазорелаксацию, которая подавлялась супероксиддисмутазой. Вазорелаксирующий эффект H_2S также значительно снижался при удалении из инкубационной среды Ca^{2+}. Кроме того, предварительная обработка тканей аорты H_2S снижала релаксацию ГМК сосудов в ответ на донор NO, НПН [35]. Эти данные демонстрируют, что сосудистый эффект H_2S частично опосредован функциональным состоянием эндотелия и зависит от поступления Ca^{2+} из внеклеточной среды, но не зависит от активации гуанилатциклазного сигнального каскада.

Таким образом, имеется достаточное число работ, посвященных анализу влияния H_2S на сосудистый тонус. Вместе с тем есть только отдельные публикации, где сообщается об ингибирующем влиянии H_2S на агрегацию тромбоцитов [36], и практически отсутствуют сведения о его действии на микрореологию эритроцитов. Полученные нами данные позволяют в некоторой степени устранить этот пробел в изучении влияния этого газотрансмиттера на текучесть крови, микрореологию эритроцитов и их транспортный потенциал [23].

Было установлено, что инкубация эритроцитов с донором H_2S гидросульфидом натрия (NaHS) сопровождалась приростом их деформируемости (на 8–12 %, $p<0,01$) и заметным уменьшением агрегации, на 16–24 % (рис. 5).

В качестве молекулярной мишени H_2S в клетках чаще всего рассматривают АТР-зависимые K^+-каналы (K^+АТР) [37]. Они блокируются глибенкламидом. В наших опытах глибенкламид не препятствовал приросту деформируемости эритроцитов под действием NaHS и не устранял полностью снижения ПАЭ (рис. 6).

С другой стороны, ингибирование р-ГЦ с помощью ODQ полностью устраняло прирост деформируемости и значительно ограничило снижение ПАЭ под влиянием NaHS (рис. 7).

Сравнение микрореологических ответов эритроцитов на действие донора H_2S в условиях блокирования K^+АТФ-каналов и ингибирования р-ГЦ позволяет предположить, что сероводород как газовый медиатор в значительной степени использует NO-ассоциированный сигнальный путь. Поскольку эндогенные концентрации H_2S обычно низкие, что затрудняет определение точных биологических функций, исследования физиологической роли H_2S с его экзогенной доставкой в виде доноров на клеточных моделях микрореологических ответов эритроцитов

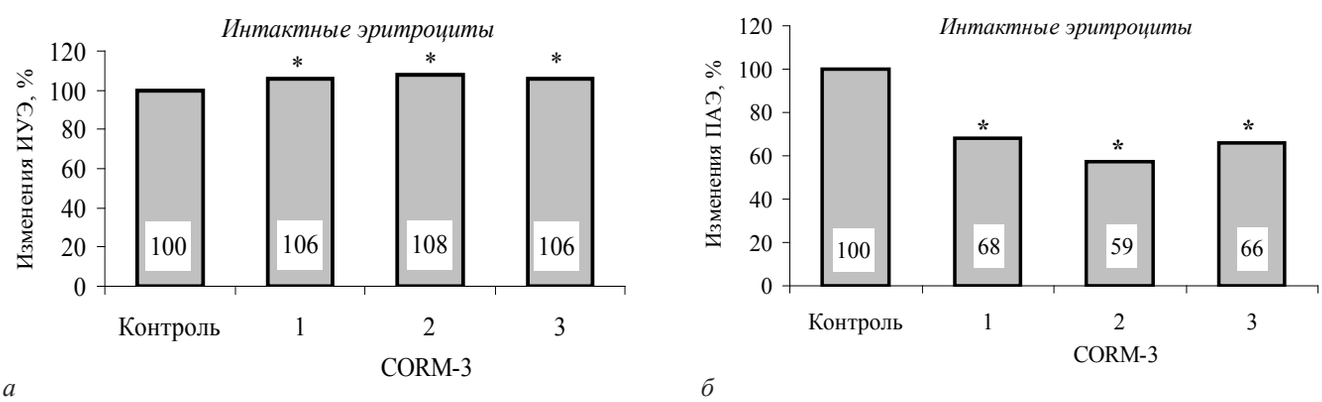

Рис. 9. Изменения деформируемости (*а*) и агрегации эритроцитов (*б*) относительно контроля после их инкубации с CORM-3 в разных концентрациях: 1 – 15 мкМ; 2 – 50 мкМ; 3 –100 мкМ; * – отличие от контроля статистически значимо ($p<0,01$)

Fig. 9. Changes in deformability (*a*) and aggregation of erythrocytes (*б*) compared to the control (cell suspension without preparation) after their incubation with CORM-3 at different concentrations: 1 – 15 μM; 2 – 50 μM; 3 –100 μM; * – difference from control is statistically significant ($p<0.01$)

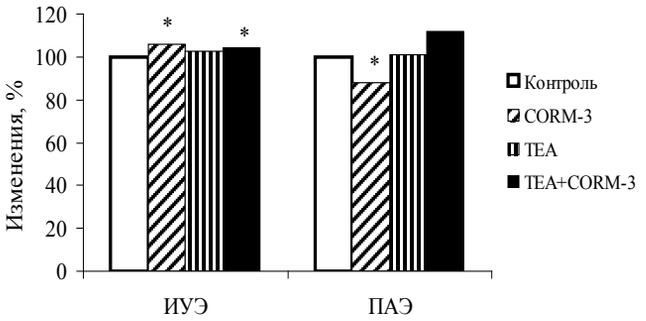

Рис. 10. Изменения деформируемости (ИУЭ) и агрегации эритроцитов (ПАЭ) под влиянием донора монооксида углерода (CORM-3) и его сочетанного воздействия с блокатором K(Ca)-каналов тетраэтиламмонием (TEA): * – отличие от контроля статистически достоверно при p<0,05

Fig. 10. Changes in deformability (IEE) and aggregation of erythrocytes (IAE) under the influence of the carbon monoxide donor (CORM-3) and its combined effect with the blocker of KCa-channels tetraethylammonium (TEA): * – the difference from the control is statistically significant at p<0.05

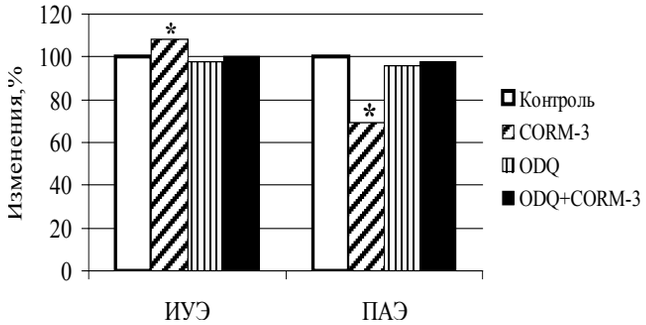

Рис. 11. Изменения деформируемости (ИУЭ) и агрегации эритроцитов (ПАЭ) под влиянием CORM-3 – донора монооксида углерода – и после ингибирования р-ГЦ с помощью ODQ: * – отличие от контроля статистически достоверно при p<0,05

Fig. 11. Changes in erythrocyte deformability (IEE) and aggregation (IAE) under the influence of CORM-3, a carbon monoxide donor, and after inhibition of s-GC by ODQ: * – the difference from the control is statistically significant at p<0.05

помогут понять механизмы его действия и уточнить внутриклеточные молекулярные мишени.

Таким образом, H_2S представляет собой важную сигнальную молекулу сердечно-сосудистой системы, подобную оксиду азота и монооксиду углерода, с сильным влиянием на функции кровообращения и микрореологию клеток крови. Понимание механизмов защитного действия H_2S на сердце и сосуды в сочетании с разработкой новых веществ-доноров, высвобождающих H_2S, может способствовать продвижению в клиническую практику этого газового медиатора.

Роль монооксида углерода в изменениях кровообращения и микрореологии клеток крови

Монооксид углерода, наряду с оксидом азота и сероводородом, принадлежит к семейству газотрансмиттеров и вовлечен в регуляцию многих физиологических процессов организма [38, 39]. Для понимания регуляторных эффектов в системе кровообращения важно иметь в виду, что CO индуцирует вазорелаксацию в результате прямого воздействия на гладкие мышцы сосудов [8]. Он образуется в процессе клеточного метаболизма с участием фермента гемоксигеназы (HO), которая вместе с NADPH-цитохром-P450-редуктазой расщепляет гемовое кольцо в гемопротеинах на биливердин, CO и железо [32, 40].

Выделены индуцибильная HO (HO-1) и конститутивная HO (HO-2). Экспрессия HO-1 реализуется как в эндотелии, так и в гладких мышцах кровеносных сосудов. Индукция HO-1 происходит как общий клеточный и тканевый ответ на стресс. Образование эндогенного CO в этих условиях может обеспечивать цитопротекцию и являться важным фактором, участвующим в модуляции тонуса сосудов при гипоксии [38].

В системе микроциркуляции CO вызывает вазодилатацию артериол, а также оказывает защитное действие на сосуды миокарда. Кроме того, эндогенный CO ингибирует агрегацию тромбоцитов и их адгезию к стенкам сосудов [41], а также регулирует роллинг и адгезию лейкоцитов [42] (рис. 8).

CO, как и другие газообразные посредники (NO и H_2S), действует через принципиально отличные от классических трансмиттеров рецептор-независимые механизмы, в том числе прямо через химическую модификацию белков ионных каналов, например, кальцийзависимых калиевых каналов [38], а также косвенно – через ряд вторичных посредников, которые влияют на основную клеточную функцию ГМК – на их сократимость [43].

Предложено три основных клеточных механизма для объяснения сосудорасширяющего действия CO, они включают в себя:

1) активацию растворимой гуанилатциклазы (р-ГЦ) [24];

2) стимуляцию различных типов K-каналов (например, Ca^{2+}-активируемых K^+-каналов [38]);

3) ингибирование системы цитохрома P450-зависимой монооксигеназы в клетках гладких мышц сосудов [32].

Было установлено, что CO расширяет артерии и артериолы за счет активации K(Ca)-каналов гладкомышечных клеток сосудов. Доноры CO и сам газовый медиатор активировали BKCa-каналы в вырезанных участках плазматической мембраны аорты, в условиях, когда цитозольные сигнальные белки отсутствуют, а киназы неактивны [7].

Известно, что эффективность доставки кислорода и субстратов окисления в тканевые микрорайоны зависит не только от состояния регионарного кровотока и микроциркуляции. На уровне обменных капилляров существенное влияние оказывает деформируемость эритроцитов, а в посткапиллярном отделе сосудистой системы – их обратимая агрегация [16]. Исследование влияние донора CO – монооксида углерода высвобождающей молекулы-3 (CORM-3) – показало, что так же, как и в ответ на доноры NO и H_2S, происходит достоверный умеренный прирост деформируемости эритроцитов (на 8–11 %, p<0,01) и выраженное уменьшение агрегации клеток, более чем на 40 % (рис. 9).

Указанные выше микрореологические эффекты дозозависимые (рис. 9). Как было показано выше,

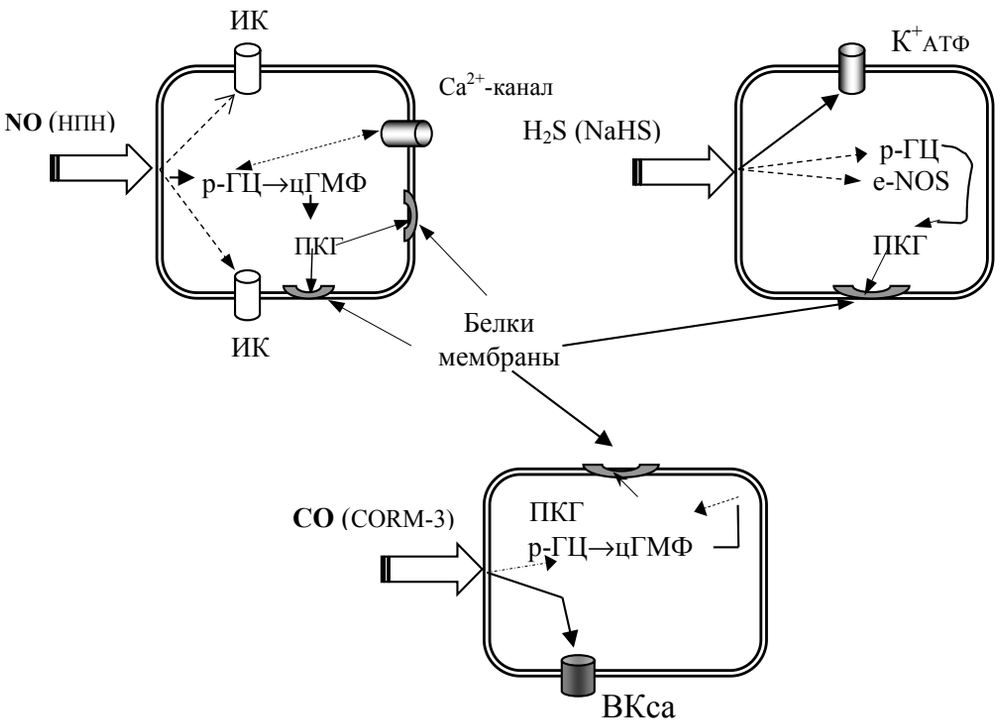

Рис. 12. Основные сигнальные пути, ассоциированные с влиянием трех доноров газотрансмиттеров на микрореологические свойства эритроцитов: ИК – ионные каналы; ПКГ – протеинкиназа Г; р-ГЦ – растворимая гуанилат-циклаза; e-NOS – NO-синтаза; ВКса – кальцийзависимые калиевые каналы; К+АТФ – АТФ-зависимые калиевые каналы

Fig. 12. The main signaling pathways associated with the influence of three donors of gasotransmitters on the microrheological properties of erythrocytes

в качестве основной молекулярной мишени для действия CO в клетках рассматривают K(Ca)-каналы. Их можно блокировать тетраэтиламмонием (TEA). Было установлено, что CORM-3 умеренно повышал ИУЭ (на 9 %, $p<0,01$), а снижение агрегации достигло 38 % ($p<0,05$). TEA уменьшил влияние CORM-3 на деформируемость эритроцитов, но не устранил его полностью. Что касается агрегации, то TEA полностью устранял снижение ПАЭ, происходящее под влиянием CORM-3 (рис. 10).

Известно, что NO- и CO-индуцированные изменения клеточных функций опосредуются с участием р-ГЦ и ц-ГМФ, хотя CO как газотрансмиттер гораздо менее эффективен при активации гуанилатциклазы, чем NO [44].

Мы проверили предположение о том, что микрореологические ответы эритроцитов могут быть связаны с этой сигнальной системой. Было найдено, что ингибитор р-ГЦ, ODQ, практически полностью устранял эффект донора CO. Это было подтверждено на двух моделях, как в опытах с деформируемостью эритроцитов, так и при регистрации их агрегации (рис. 11).

Если ингибировать активность NO-синтазы (NOS) с помощью N-Nitroarginine methyl ester (L-NAME, 200 мкМ), то, как и при воздействии на р-ГЦ, полностью устраняется микрореологический эффект донора CO. Более того, под влиянием отдельно L-NAME и его сочетанном воздействии с CORM-3 агрегация эритроцитов заметно возрастала (на 14 %). Следует полагать, что ингибитор NO-синтазы обладает выраженным проагрегантным свойством.

Рассмотрение влияния CO на микрореологические свойства эритроцитов и анализ вероятных внутриклеточных сигнальных путей позволили установить положительные эффекты этого газотрансмиттера, которые по направленности и величине были сопоставимы с двумя другими газовыми медиаторами – оксидом азота и сероводородом. В целом очевидно, что монооксид углерода является важной сигнальной молекулой в системе кровообращения, он участвует как в регуляции тонуса сосудов, так и в изменениях микрореологических свойств клеток крови. Для эффективного транспорта кислорода в тканевые микрорайоны важно положительное влияние этого газотрансмиттера на деформируемость эритроцитов и на их обратимую агрегацию. Многие из основных механизмов, контролирующих паракринно артериолы, зависят от передачи сигналов, которые могут исходить от эритроцитов, которые выступают и как сенсоры и как регуляторы локального кровотока [45].

Заключение

На основе проведенного анализа литературы и рассмотрения собственных данных исследования микрореологических ответов эритроцитов на доноры трех газотрансмиттеров можно заключить, что каждый из них является:

– одной из важных эндогенных сигнальных молекул;

– модулирует функции сердечно-сосудистой системы и микрореологии клеток крови;

– ингибирует агрегацию эритроцитов и особенно тромбоцитов, их адгезию к стенкам сосудов, а также

повышает деформируемость эритроцитов и их кислородтранспортные возможности;

– является перспективным соединением, которое может быть включено в одну из важных терапевтических стратегий при ряде заболеваний.

Для всех трех газотрансмиттеров выявлены наиболее вероятные сигнальные каскады с ключевыми молекулярными мишенями. Поскольку все три газотрансмиттера – H_2S, NO и CO – имеют схожие способы действия и параллельные регулирующие цели, то накапливается все больше свидетельств о кросс-общении между этими газовыми медиаторами [8]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что H_2S и CO используют в своих эффектах NO-ассоциированный сигнальный путь (рис. 12). При этом газотрансмиттер или стимулирует р-ГЦ, или активирует NOS для последующего синтеза оксида азота, который далее и выполняет регуляторную роль [27, 44].

Дальнейшие исследования призваны уточнить роль газотрансмиттеров в понимании патогенных механизмов многих болезней, связанных с нарушениями их метаболизма, а также проложить путь для инновационных, профилактических и терапевтических стратегий, основанный на физиологических эффектах газотрансмиттеров.

Финансирование / Acknowledgments

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-515-00019. / The reported study was funded by RFBR and BRFBR, project number 20-515-00019.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Автор заявили об отсутствии конфликта интересов. / The author declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. The Journal of Pathology. 2000;190(3):244–254. Doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190.

2. Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH. Signaling by gasotransmitters. Sci Signal. 2009;2(68):2. Doi: 10.1126/scisignal.268re2. PATH575>3.0.CO;2-8.

3. Sélley E, Kun S, Szijártó IA et al. Exenatide induces aortic vasodilation increasing hydrogen sulphide, carbon monoxide and nitric oxide production. Cardiovascular Diabetology. 2014;(13):69–76. Doi: 10.1186/1475-2840-13-69.

4. Belew M, Quazi F, Willmore W, Aitken S. Kinetic characterization of recombinant human cystathionine β-synthase purified from E. coli. Protein Expression and Purification. 2009;(64):139–145. Doi: 10.1016/j.pep.2008.10.012.

5. Ситдикова Г. Ф., Яковлев А. В., Зефиров А. Л. Газомедиаторы: от токсических эффектов к регуляции клеточных функций и использованию в клинике // Бюлл. сибир. мед. – 2014. – Т. 13, № 6. – С. 185–200. [Sitdikova GF, Yakovlev AV, Zefirov AL. Gasotransmitters: from the toxic effects to the regulation of cellular function and clinical application. Bulletin of Siberian Medicine. 2014;13(6):185–200. (In Russ.)]. Doi: 10.20538/1682-0363-2014-6-185-200.

6. Martelli A, Testai L, Breschi MC, Lawson K, McKay NG, Miceli F, Taglialatela M, Calderone V. Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels. Pharmacol Res. 2013;(70):27–34. Doi: 10.1016/j.phrs.2012.12.005.

7. Jaggar JH, Li A, Parfenova H, Liu J, Umstot ES, Dopico AM, Leffler CW. Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels. Circ Res. 2005;(97):805–812. Doi: 10.1161/01.RES.0000186180.47148.7b.

8. Wang R. Gasotransmitters: growing pains and joys. Trends Biochem Sci. 2014;39(5):227–232. Doi: 10.1016/j.tibs.2014.03.003.

9. Ignaro LG, Buga GM, Wood KS. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc. Nat. Acad. Shi. USA. 1987;(84):9265–9269. Doi: 10.1073/pnas.84.24.9265.

10. Dessy C, Ferron O. Pathophysiological Roles of Nitric Oxide: In the Heart and the Coronary Vasculature. Current Medical Chemistry – Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents. 2004;3(3):207–216. Doi: 10.2174/1568014043355348.

11. Derbyshire ER, Marletta MA. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. Annu. Rev. Biochem. 2012;(81):533–539. Doi: 10.1146/annurev-biochem-050410-100030.

12. Wobst J, Rumpf PM, Dang TA, Segura-Puimedon M, Erdmann J, Schunkert H. Molecular variants of soluble guanylyl cyclase affecting cardiovascular risk. Circ. J. 2015;(79):463–469. Doi: 10.1253/circj.CJ-15-0025.

13. Irwin C, Roberts W, Naseem KM. Nitric oxide inhibits platelet adhesion to collagen through cGMP-dependent and independent mechanisms: the potential role for S-nitrosylation. Platelets. 2009;(20):478-486. Doi: 10.3109/09537100903159375.

14. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J. 2012;33(7):829–837. Doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.

15. Buerk DG, Barbee KA, Jaron D. Nitric oxide signaling in the microcirculation. Crit Rev Biomed Eng. 2011;39(5):397–433.

16. Popel AS, Johnson PC. Microcirculation and Hemorheology. Annu. Rev. Fluid. Mech. 2005;(37):43–69. Doi: 10.1146/annurev.fluid.37.042604.133933.

17. Salazar Vázquez, Tsai AG, Intaglietta M. Nonlinear cardiovascular regulation consequent to changes in blood viscosity. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2011;49(1–4):29–36. Doi: 10.3233/CH-2011-1454.

18. Sprague RS, Ellsworth ML. Erythrocyte-derived ATP and perfusion distribution: role of intracellular and intercellular communication. Microcirculation. 2012;19(5):430–439. Doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00158.x.

19. Kleinbongard P, Keymel S, Kelm M. New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood. Thromb Haemost. 2007;98(5):970–974.

20. Uyuklu M, Meiselman HJ, Baskurt OK. Role of hemoglobin oxygenation in the modulation of red blood cell mechanical properties by nitric oxide. Nitric Oxide. 2009;(21):20–26. Doi: 10.1016/j.niox.2009.03.004.

21. Ulker P, Sati L, Celik-Ozenci C, Meiselman HJ, Baskurt OK. Mechanical stimulation of nitric oxide synthesizing mechanisms in erythrocytes. Biorheology. 2009;46(2):121–132. Doi: 10.3233/BIR-2009-0532.

22. Mozar A, Connes P, Collins B, Hardy-Dessources MD, Romana M, Lemonne N, Bloch W, Grau M. Red blood cell nitric oxide synthase modulates red blood cell deformability in sickle cell anemia. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2016;(64):47–53. Doi: 10.3233/CH-162042.

23. Muravyov AV, Antonova N, Tikhomirova IA. Red blood cell micromechanical responses to hydrogen sulfide and nitric oxide donors: Analysis of crosstalk of two gasotransmitters (H_2S and NO). Series on Biomechanics. 2019;(33):34–40.

24. Feelisch M, Kotsonis P, Siebe J, Clement B, Schmidt HH. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxa-

diazolo[4,3,-a] quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. Mol. Pharmacol. 1999;56(2):243–253. Doi: 10.1124/mol.56.2.243.

25. Starzyk D, Korbut R, Gryglewski RJ. Effects of nitric oxide and prostacycline on deformability and aggregability of red blood cells of rats ex vivo and in vitro. J Physiol Pharmacol. 1999;(50):629–637.

26. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. Mol Aspects Med. 2005; 26(1–2):33–65. Doi: 10.1016/j.mam.2004.09.003.

27. Wallace JL, Ianaro A. Signal Transduction and the Gasotransmitters. NO, CO and H_2S in Biology and Medicine. Totowa, Humana Press, 2004:377.

28. Mancardi D, Penna C, Merlino A, Del Soldato P. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: Hydrogen sulfide. Biochimica et Biophysica Acta. 2009; (1787):864–872. Doi: 10.1016/j.bbabio.2009.03.005.

29. ShenY, Shen Z, Luo S, Guo W, Zhu YiZ. The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2015. Article ID: 925167:13. Doi: 10.1155/2015/925167.

30. Kamoun H. H2S, a new neuromodulator. Medecine/Sciences. 2004;20(6–7):697–700. Doi: 10.1051/medsci/2004206-7697.

31. Giuffrè A, Vicente JB. Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology. Oxid. Med. Cell Longev. 2018:6290931. Doi: 10.1155/2018/6290931.

32. Beltowski J. Hydrogen sulfide as a biologically active mediator in the cardiovascular system. Postepy. Hig. Med. Dosw. 2004;(58):285–291.

33. Geng B, Yang J, Qi Y, Zhao J, Peng Y, Du J, Tang C. H_2S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. Biochem.Biophys. Res. Commun. 2004;(313):362–368. Doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.130.

34. Smith RP. A short history of hydrogen sulfide. American Scientist. 2010;(98):6–9. Doi: 10.1511/2010.82.6.

35. Zhao, Weimin, Rui Wang. H2S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;(283):474–480. Doi: 10.1152/ajpheart.00013.

36. Truss NJ, Warner TD. Gasotransmitters and platelets. Pharmacol. Ther. 2011;(132):196–203. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.07.001.

37. Green BD, Hand KV, Dougan JE, McDonnell BM, Cassidy RS, Grieve DJ. GLP-1 and related peptides cause concentration-dependent relaxation of rat aorta through a pathway involving KATP and cAMP. Arch Biochem Biophys. 2008;(478):136–142. Doi: 10.1016/j.abb.2008.08.001.

38. Leffler ChW, Parfenova H, Jaggar JH. Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2011;(301):1–11. Doi: 10.1152/ajpheart.00230.2011.

39. Durante W, Peyton KJ, Schafer AI. Platelet-derived growth factor stimulates heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. Arterioscler. Thromb. Vasc.Biol. 1999;(19):2666–2672. Doi: 10.1161/01.ATV.19.11.2666.

40. Wang R. Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. Can J 1998;76(1):1–15. Doi: 10.1139/cjpp-76-1-1.

41. Brune B, Ullrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. Mol Pharmacol. 1987;(32):497–504.

42. Shinobu Hayashi, Rina Takamiya, Tokio Yamaguchi, Kenji Matsumoto, Shinichiro J. Tojo, Takuya Tamatani, Masaki Kitajima, Nobuya Makino, Yuzuru Ishimura, Makoto Suematsu. Induction of Heme Oxygenase-1 Suppresses Venular Leukocyte Adhesion Elicited by Oxidative Stress: Role of Bilirubin Generated by the Enzyme. Circulation Research. 1999; 85(8): 663–671. Doi: 10.1161/01.RES.85.8.663.

43. Jaggar JH, Parfenova H, Liu J. Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca2+-activated K+ channels. Circ. Res. 2007;(97):805–812.

44. Koneru P, Leffler CW. Role of cyclic GMP in carbon monoxide induced vasodilation in piglets. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;(286):304–309. Doi: 10.1152/ajpheart.00810.2003.

45. Ellsworth ML, Ellis CG, Goldman D. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. Physiology. 2009;(24):107–116. Doi: 10.1152/physiol.00038.2008.

Информация об авторе

Муравьев Алексей Васильевич – д-р биол. наук, профессор кафедры медико-биологических основ спорта, Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского, г. Ярославль, Россия, ORCID: 0000-0002-5502-9164, e-mail: alexei.47@mail.ru.

Information about author

Muravyov Aleksey V. – MD (Biology), PhD, Professor, Department of Medical and Biological Fundamentals of Sports, Yaroslavl state pedagogical university named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia, ORCID: 0000-0002-5502-9164, e-mail: alexei.47@mail.ru.