

Министерство образования и науки РФ

**Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего профессионального образования  
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

**БИОЛОГО-ПОЧВЕННЫЙ ФАКУЛЬТЕТ**

**КАФЕДРА ФИЗИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

Направление: 020200.68 Биология

Квалификация: Магистр Биологии

Профиль: Нейробиология

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

(Магистерская диссертация)

**РОЛЬ СЕРОВОДОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ ОСВОБОЖДЕНИЯ  
МЕДИАТОРА В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ МЫШИ**

**Работа завершена:**

«26» мая 2012г. (Лебедева Ю.А.)

**Работа допущена к защите:**

Научный руководитель

д.б.н., профессор

«27» мая 2012г. (Ситдикова Г.Ф.)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«27» мая 2012г. (Ситдикова Г.Ф.)

Казань – 2012

## СОДЕРЖАНИЕ

	Список сокращений	4
	ВВЕДЕНИЕ	5
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1	Особенности газообразных посредников как регуляторов физиологических функций	7
1.2	Сероводород, структура, физико-химические свойства	9
1.3	Ферментативный синтез сероводорода	10
1.4	Токсичные эффекты и эндогенные концентрации сероводорода	12
1.5	Физиологическая роль сероводорода и его эффекты в нервной системе	13
1.6	Основные характеристики рианодиновых рецепторов	17
1.7	Роль рианодиновых рецепторов в секреции медиатора	19
1.8	Аденилатциклазный путь передачи информации в нервной системе	20
1.9	ЦАМФ/ПКА в нервно-мышечном синапсе	24
2	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	26
2.1	Объекты, методы и оборудования	26
2.1.1	Экспериментальная ванночка и система перфузии	26
2.1.2	Изготовление, заполнение и подведение микроэлектродов	27
2.1.3	Регистрация биопотенциалов	28
2.1.4	Статистическая обработка экспериментальных данных	28
2.2	Результаты исследований и их обсуждение	29
2.2.1	Эффект NaHS на вызванную и спонтанную секрецию медиатора	29

2.2.2	Влияние субстрата и блокаторов синтеза H <sub>2</sub> S на вызванное освобождение медиатора	32
2.2.3	Действие NaHS на фоне кофеина и блокатора фосфодиэстераз	34
2.2.4	Действие NaHS на фоне блокатора аденилатциклазы и аналога цАМФ	36
	ВЫВОДЫ	40
	ЛИТЕРАТУРА	41

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

H<sub>2</sub>S - сероводород

NO - оксид азота

CO -monoоксид углерода

CBS - цистатионин  $\beta$ -синтаза

CSE - цистатионин  $\gamma$ -лиаза

ГЭР - гладкий эндоплазматический ретикулум  
Ри-рецепторы, РиР - рианодиновые рецепторы  
АЦ - аденилатцилаза  
цАМФ - циклический аденоzinмонофосфат  
ПКА - цАМФ-зависимая протеинкиназа  
ФДЭ - фосфодиэстеразаNaHS - гидросульфид натрия  
ТКП – токи концевой пластиинки  
МТКП - миниатюрные токи концевой пластиинки  
IBMX - 3-Isobutyl-1-methylxanthine - блокатор фосфодиэстераз  
MDL-12330A - ингибитор аденилатцилазы

## ВВЕДЕНИЕ

Сероводород ( $H_2S$ ) – хорошо известный токсичный газ, который в последнее время наряду с оксидом азотом (NO) иmonoоксидом углерода (CO) относят к новому классу эндогенных модуляторов физиологических функций (Mustafa et al., 2009). В научных исследованиях в качестве донора  $H_2S$  используют гидросульфид натрия (NaHS), диссоциирующий в водных

растворах до иона натрия ( $\text{Na}^+$ ) и гидросульфидного аниона, который, реагируя с протоном ( $\text{H}^+$ ), образует  $\text{H}_2\text{S}$ . Эндогенно  $\text{H}_2\text{S}$  синтезируется из L-цистеина пиридоксаль-5'-фосфат-зависимыми ферментами - цистатионин  $\beta$ -синтазой (CBS) и цистатионин  $\gamma$ -лиазой (CSE) (Stipanuk et al., 1982; Swaroop et al., 1992). Экспрессия ферментов CBS и CSE является тканеспецифичной. CBS, являющийся основным ферментом синтеза  $\text{H}_2\text{S}$  в мозге, также экспрессируется в печени и почках (Meier et al., 2001; Wang 2002). Второй фермент, катализирующий синтез  $\text{H}_2\text{S}$  - CSE, обнаружен, в основном, в почках, печени, сердечно-сосудистой системе, гладких мышцах (Lu et al., 1992; Van der Molen et al., 1997; Yap et al., 2000; Zhao et al., 2001). В центральной нервной системе  $\text{H}_2\text{S}$  усиливает индукцию долговременной потенциации в гиппокампе (Abe et al., 1996), регулирует активность серотонинергических нейронов, освобождение кортикотропного гормона гипофиза (Russell et al., 2000; Kombian et al., 1993). Как и другие газы  $\text{H}_2\text{S}$  расслабляет гладкие мышцы (Hosoki et al., 1997; Zhao et al., 2001), кроме того,  $\text{H}_2\text{S}$  защищает нейроны и миокард от оксидативного стресса (Kimura et al., 2006; Sivarajah et al., 2006) и регулирует секрецию инсулина (Ali et al., 2007; Kaneko et al., 2006). Показано, что  $\text{H}_2\text{S}$  приводит к увеличению внутриклеточного кальция в астроцитах и вызывает кальциевые волны, опосредуя взаимодействие между нейронами и глией (Nagai et al., 2004).  $\text{H}_2\text{S}$  стимулирует капсаицин-чувствительные сенсорные нервные окончания, вызывая секрецию тахикининов, вещества Р и нейрокинина А, и вызывает дозозависимое сокращение мышц мочевого пузыря у крысы (Patacchini et al., 2004). Были получены данные о регуляции секреции медиатора сероводородом и возможности его эндогенного синтеза в нервно-мышечном синапсе холоднокровных (Gerasimova et al., 2008), тогда как роль  $\text{H}_2\text{S}$  в регуляции синаптической передачи у теплокровных животных не исследована.

Целью работы явилось выявление роли сероводорода в регуляции освобождения медиатора в нервно-мышечном синапсе мыши. В связи с поставленной целью были выполнены следующие задачи:

1. Исследовать влияние донора  $H_2S$  - гидросульфида натрия (NaHS) на спонтанную и вызванную секрецию медиатора из двигательного нервного окончания мыши
2. Исследовать эффекты блокаторов ферментов синтеза  $H_2S$   $\beta$ -циано-L-аланина и аминооксиацетиловой кислоты и субстрата эндогенного синтеза  $H_2S$  – L-цистеина на вызванную секрецию медиатора
3. Выявить роль рианодиновых рецепторов и цАМФ-зависимых механизмов в эффектах сероводорода

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Особенности газообразных посредников как регуляторов физиологических функций

В последнее десятилетие был открыт новый класс газообразных посредников, к которому относятся такие газы как оксид азота (NO),monoоксид углерода (CO) и сероводород (H<sub>2</sub>S) (Garthwaite, Boulton, 1995б; Boehning, Snyder, 2003; Wang, 2002; Wang ,2004; Ситдикова, Зефиров; 2006; Qu et al., 2008). Это особая группа веществ (табл. 1), осуществляющих как межклеточную, так и внутриклеточную регуляцию разнообразных физиологических функций. NO, CO, H<sub>2</sub>S являются небольшими молекулами, легко проникают через мембрану. Газообразные посредники образуются в нейронах в ответ на вход ионов Ca<sup>2+</sup>, однако, будучи газами, они выделяются из любого участка клетки, не запасаются в везикулах и не освобождаются экзоцитозом. Кроме того, для них не существует рецепторов на постсинаптической мембране, и они диффундируют в соседние клетки, где связываются с «ферментным рецептором». В отличие, от классических медиаторов газы обычно участвуют в передаче ретроградного сигнала от пост- к пресинаптическому нейрону, а также могут вырабатываться в клетках глии. Данные газы эндогенно синтезируются с помощью ферментов и их синтез является регулируемым (Wang, 2004; Ситдикова, Зефиров, 2006; Boehning, Snyder, 2003). В физиологических концентрациях газы проявляют хорошо выраженные специфические функции, так, например, все они являются эндогенными вазорелаксантами, участвуют в индукции и поддержании долговременной потенциации в мозге. Клеточные эффекты газов опосредуются либо через систему внутриклеточных посредников, либо они оказывают прямое влияние на субъединицы ионных каналов, белки экзоцитоза, внутриклеточные ферменты (Ситдикова, Зефиров, 2006; Wang, 2004). В двигательных нервных окончаниях холоднокровных обнаружено, что NO, CO и H<sub>2</sub>S являются модуляторами освобождения медиатора.

Таблица 1. Метаболизм и функции газообразных посредников

	NO	CO	H <sub>2</sub> S
Субстрат	L-аргинин	Гем	L-цистеин
Фермент	NO-синтаза (eNOS, iNOS, nNOS)	Гемоксигеназа (ГО-1, ГО-2)	Цистатионин $\beta$ -синтаза цистотионин $\gamma$ -лиаза
Регуляция синтеза	Са/кальмодулин	Са/кальмодулин Протеинкиназа С	Са/кальмодулин
Мишени действия	Растворимая гуанилатциклаза, K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , K(Ca) каналы	Растворимая гуанилатциклаза, K(Ca) каналы	K(АТФ)-каналы
Система связывания	Гемоглобин	Гемоглобин	Гемоглобин
Время полураспада	Секунды	Минуты	Минуты

Было показано, что H<sub>2</sub>S усиливает спонтанное и вызванное освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки (Gerasimova et al., 2008). При этом экзогенный CO усиливает как спонтанную, так и вызванную секрецию медиатора. Так же показано, что NO угнетает спонтанную и вызванную секрецию медиатора и модифицирует потенциал-зависимые и кальций-активируемые калиевые каналы нервного окончания лягушки (Lindgren, Laird, 1994; Tomas, Robitaille, 2001; Яковлев и др., 2005). Выявлены возможные мишени и внутриклеточные механизмы действия NO и CO в нервном окончании (Sitdikova et al., 2007), а так же эффекты H<sub>2</sub>S в нервно-мышечном синапсе холоднокровных животных (Gerasimova et al., 2008).

## 1.2 Сероводород, структура, физико-химические свойства

Сероводород ( $\text{H}_2\text{S}$ ) – бесцветный газ с сильным запахом. Сероводород растворим в воде, при нормальном давлении и  $20^{\circ}\text{C}$  его концентрация в водных растворах соответствует  $0,098$  моль/л ( $\sim 10^{-1}$  моль/л). Раствор сероводорода в воде (сероводородная вода) является очень слабой двухосновной кислотой. В водных растворах при  $\text{pH}=7,4$  около одной трети  $\text{H}_2\text{S}$  не подвергается диссоциации и две трети диссоциируют до  $\text{H}^+$  и  $\text{HS}^-$  (гидросульфидного аниона), который в последствии может разложиться до  $\text{H}^+$  и  $\text{S}^{2-}$ .



Однако последняя реакция происходит только при высоком  $\text{pH}$ , поэтому концентрация  $\text{S}^{2-}$  *in vivo* незначительна (Lowicka, 2007; Михайленко, 1966; Abe, Kimura, 1996). В окислительно-восстановительном отношении  $\text{H}_2\text{S}$  – сильный восстановитель. В реакции с окислителями его молекула теряет 2, 6 и 8 электронов (Михайленко, 1966).

Гидросульфид натрия ( $\text{NaHS}$ ) обычно используют как донор  $\text{H}_2\text{S}$ , так как в водной среде он диссоциирует до  $\text{Na}^{2+}$  и  $\text{HS}^-$ , далее  $\text{HS}^-$  взаимодействует с  $\text{H}^+$  и формирует недиссоциированный  $\text{H}_2\text{S}$  (Lowicka, 2007). Показано, что  $\text{NaHS}$  количественно является таким же эффективным, как и раствор, полученный при перфузии газообразным сероводородом (Zhao, Wang, 2002). При  $\text{pH}=7,4$  и температуре  $20^{\circ}$  раствор сероводорода содержит около 30-33% газа ( $\text{H}_2\text{S}$ ) и 67-70%  $\text{HS}^-$  (Hosoki et al., 1997, Zhao, Wang, 2002).

Продуктами окисления сероводорода могут быть элементарная сера ( $\text{S}$ ), оксид серы ( $\text{SO}_2$ ) и сульфаты, такие как серная кислота ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Михайленко, 1966). Подобно  $\text{NO}$  и  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  липофилен и свободно проникает через плазматическую мембрану, хотя его проницаемость ниже, чем для  $\text{NO}$  и  $\text{CO}$  в связи с частичной диссоциацией (Lowicka, 2007).

### 1.3 Ферментативный синтез сероводорода

$\text{H}_2\text{S}$  синтезируется в значительных количествах во многих тканях. Самая высокая скорость синтеза  $\text{H}_2\text{S}$  была отмечена в мозге, сердечно-сосудистой системе, печени и почках (Lu et al., 1992; Van der Molen et al., 1997; Yap et al., 2000; Distrutti, Sediar, 2006). Существует два основных направления метаболизма цистеина (Stipanuk, 2004; Lowiska, 2007) (Рис.1). Один из них – окисление -SH группы цистеина цистеин диоксигеназой (CDO) до цистеинсульфината, который может декарбоксилироваться до гипотаурина или преобразовываться до пирувата и сульфита, впоследствии окисляющегося сульфит оксидазой до сульфата. Константа Михаэлиса ( $K_m$ ) для цистеин диоксигеназы составляет приблизительно 0,4 мМ, что позволяет ферменту отвечать на физиологические концентрации цистеина (Dominy, Stipanuk, 2004). Так как концентрации цистеина в тканях составляют около 1 мкМ, этот фермент ограничивает синтез сероводорода в реакциях десульфигидратации.

Второй путь – "десульфигидратация", в котором отщепление атома серы цистеина без окисления ведет к образованию  $\text{H}_2\text{S}$ . Этот процесс может катализироваться любым из двух ферментов транссульфирования: цистатионин- $\beta$ -сигматазой (CBS, EC) и цистатионин- $\gamma$ -лиазой (CSE, EC) (Рис.1).

Оба эти фермента являются пиридоксаль-5' фосфат (витамин В6)-зависимые, но отличаются по механизму формирования  $\text{H}_2\text{S}$  (рис. 1). CSE катализирует преобразование цистина (дисульфид цистеин) до тиоцистеина, пирувата и аммиака; тиоцистеин затем неферментативно преобразуется до цистеина и  $\text{H}_2\text{S}$ .

Основной механизм образования  $\text{H}_2\text{S}$  под действием CBS – это конденсация гомоцистеина с цистеином, что ведет к образованию цистатионина, и  $\text{H}_2\text{S}$  образуется в ходе этой реакции (Lowiska, 2007). Эта реакция близка к реакции, катализируемой CBS в пути транссульфирования, где серин конденсируется с гомоцистеином, в процессе реакции выделяется  $\text{H}_2\text{O}$ .

CBS и CSE широко распространены в тканях, однако, CBS - преобладающий источник для синтеза H<sub>2</sub>S в центральной нервной системе, тогда как CSE - главный фермент создания H<sub>2</sub>S в сердечно-сосудистой системе. В некоторых тканях, в печени и почках, оба фермента вносят свой вклад в производство H<sub>2</sub>S. Считается, что количественно преобладающий путь катаболизма цистеина - транссульфирение, однако, предполагают, что путь десульфогидратации с последующей продукцией H<sub>2</sub>S в некоторых тканях составляет до 50% метаболизма цистеина, например, в клетках почек (Stipanuk, De la Rosa, 1990).

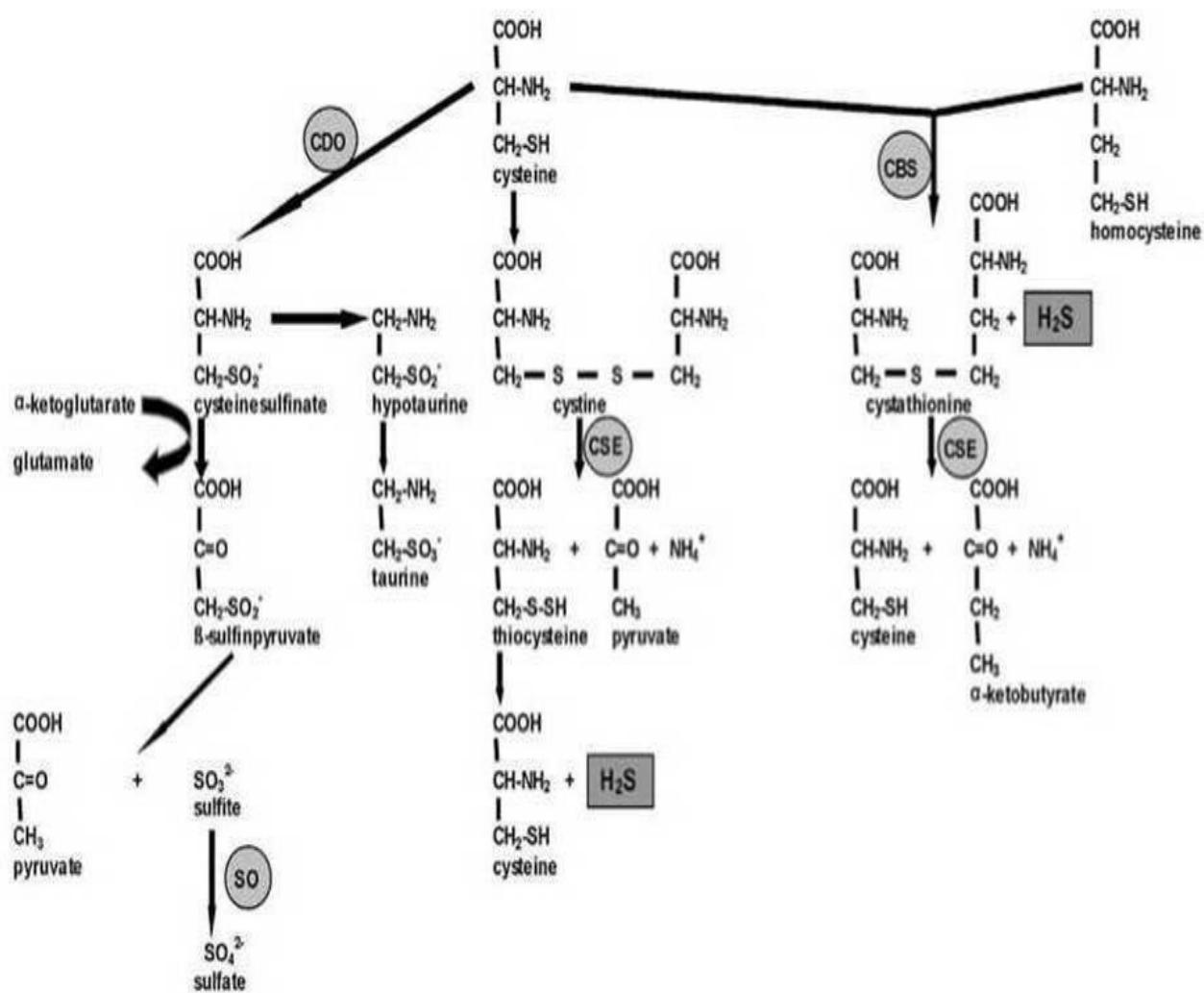


Рисунок 1 – Метаболизм цистеина:  
CDO – цистатионин диоксигеназа, SO – сульфодиоксигеназа, CSE – цистатионин γ-лиаза, CBS – цистатионин β-синтаза (Lowicka, 2007)

## 1.4 Токсичные эффекты и эндогенные концентрации сероводорода

Токсичность сероводорода известна уже на протяжение 300 лет (Reiffenstein et al. 1992, Truong, 2006). Большинство летальных последствий из-за интоксикации сероводородом связано с его действием на дыхательные центры ствола мозга. Длительное экспонирование  $H_2S$  в высоких концентрациях больше 500 ppm приводит к возникновению дыхательного паралича и может привести к смерти в течение нескольких минут (Beauchamp et al., 1984; Roth, 1993). В основе токсических эффектов  $H_2S$  лежит ингибирование цитохрома С оксидазы, что вызывает нарушения процесса окислительного фосфорилирования (Reiffenstein et al. 1992; Dorman et al., 2002).

Показано, что при хронической интоксикации  $H_2S$  или сульфидными солями происходит изменение секреции нейромедиаторов и их содержания в различных областях мозга. (Warenycia, Goodwin, 1989).

Исследования на человеке показали, что  $H_2S$  дозозависимо вызывал различные нарушения в дыхательной, сердечно-сосудистой и нервной системах.  $H_2S$  в концентрации меньше 50 ppm приводил к раздражению слизистых дыхательных путей и глаз, приводил к отекам носовой полости, легких (Reiffenstein et al., 1992).

В экспериментах на крысах показано, что  $H_2S$  в концентрации 80 ppm вызывает некроз слизистой носа и обонятельного эпителия (Brenneman et al., 2002). Хроническое экспонирование  $H_2S$  приводит к его накоплению в различных тканях и нарушению окислительного фосфорилирования. Однако при концентрациях  $H_2S$  меньше 30 ppm (~800 мкМ) подобных изменений не наблюдалось, что, вероятно, является следствием быстрого окисления газа в митохондриях (Khan, et al., 1990, Dorman et al., 2002).

Эндогенно генерируемый  $H_2S$  в нормальных условиях не накапливается и не оказывает токсического воздействия на клетку благодаря сбалансированному клеточному метаболизму этого газа (Beauchamp et al., 1984). Грань между физиологическими и токсическими

эффектами  $H_2S$  очень тонкая (Warencia, 1989). Поэтому клетки млекопитающих должны иметь четкий регуляторный механизм контроля эндогенного уровня  $H_2S$  в физиологически допустимых пределах (Wang, 2002).

Ряд аналитических методов, включая спектрометрию, ионную хроматографию, газовую хроматографию, потенциометрию с сульфид-чувствительными электродами, используется для определения уровня сульфидов в биологических образцах, однако, они обычно включают в себя несколько промежуточных химических реакций и/или хромотографических процедур и основаны на превращения сульфидов в  $H_2S$  или  $S^{2-}$  в кислой или щелочной среде, соответственно. В этих условиях оценка уровня  $H_2S$  может быть завышена (Doeller 2005).

Исследования уровня лабильной серы в тканях мозга и плазме крови у различных животных выявили эндогенные уровни сульфидов от нано- до микромолярных концентраций (Ubuka, 2002).

## 1.5 Физиологическая роль сероводорода и его эффекты в нервной системе

Первые предположения о физиологической роли  $H_2S$  возникли в 1989 г. после появления данных о высоком эндогенном уровне сульфида в срезах мозга крысы (1.6 мкг/г) и стволе мозга человека (0.7 мкг/г) (Goodvin, 1989). Транскрипционная экспрессия CBS в мозге крысы (гиппокамп, мозжечок, кора и ствол мозга) с использованием анализа Northern blot была впервые показана в 1996 году, при этом мРНК CSE не была выявлена (Abe, Kimura, 1996). Другим показателем того, что CBS является основным ферментом синтеза  $H_2S$  в мозге было то, что ингибирование CBS гидроксиламином и аминооксиацитиловой кислотой приводило к блокаде синтеза  $H_2S$ , тогда как ингибиторы CSE, пропаргилглицин и  $\beta$ -цианоаланин были неэффективны (Eto, Kimura, 2002).

Показано, что физиологические концентрации NaHS (10-130 мкМ) вызывают долговременную потенциацию в срезах гиппокампа крысы в условиях низкочастотной стимуляции, которая сама ее не вызывает (Abe, Kimura, 1996). Механизмы этого эффекта связаны с увеличением НМДА-вызванного входящего тока (рис. 3). Поэтому, возможно, что H<sub>2</sub>S эффективен только в активных синапсах. Об участии H<sub>2</sub>S в синаптической активности свидетельствует и тот факт, что у мышей, нокаутированных по гену CBS, нарушалось развитие долговременной потенциации (Eto, 2002).

Исследование внутриклеточных механизмов действия H<sub>2</sub>S позволило предположить, что эффект газа на активность НМДА-рецепторов опосредован через активацию цАМФ-зависимой протеинкиназы (Kimura, 2000, Qu et al., 2008). С помощью иммуногистохимического анализа на первичных культурах мозга определяли уровень цАМФ. NaHS в микромолярных концентрациях вызывал увеличение уровня цАМФ в клетках нейронов и глии. Известно, что активация протеинкиназы А усиливает активность НМДА рецепторов (Huang et al., 1993), по-видимому, H<sub>2</sub>S регулирует активность НМДА - рецепторов посредством увеличения внутриклеточного содержания цАМФ. Было показано, что дозозависимый эффект NaHS ответа НМДА рецепторов в первичных культурах гиппокампа, нейронах, клетках глии и овоцитах полностью снимался специфическим блокатором аденилатциклазы – MDL-12330A (Kimura, 2000).

Некоторые данные указывают на то, что H<sub>2</sub>S может регулировать функционирование не только нейронов, но и астроцитов (рис. 3). Было показано, что H<sub>2</sub>S и NaHS увеличивают концентрацию внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и вызывают Ca<sup>2+</sup> волны в культурах астроцитов (Nagai, Tsugane, 2004; Garcia-Berenguera et al., 2008).

H<sub>2</sub>S может также оказывать влияние на периферическую нервную систему. Например, H<sub>2</sub>S стимулировал капсаицин-чувствительные сенсорные нервные окончания вызывая секрецию такихининов, вещества Р и нейрокинина А. H<sub>2</sub>S вызывал дозозависимое сокращение мышц мочевого пузыря у крысы (Patacchini et al., 2004). Так же было показано, что апликация донора H<sub>2</sub>S

NaHS усиливала спонтанное и вызванное освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки (Gerasimova et al., 2008).

Выявлено, что  $H_2S$  вызывал уменьшение KCl-вызванного освобождения кортикотропного гормона дозозависимым образом в срезах гипоталамуса у крысы (Dello Russo et al., 2000). Тот же эффект наблюдался и при аппликации активатора синтеза  $H_2S$  – S-аденозилметионина. Кроме того, S-аденозилметионин уменьшал повышение концентраций глюкокортикоидов в плазме крови, вызванное стрессом, что позволяет предположить участие  $H_2S$  в регуляции гипоталамо-гипофизарной системы (Dello Russo et al, 2000).

Многочисленные экспериментальные данные указывают на то, что  $H_2S$  может участвовать и в развитии различных нейродегенеративных заболеваний. Известно, что ген CBS расположен в 21 хромосоме, поэтому возникновение трисомии 21 хромосомы при синдроме Дауна приводит к повышенной экспрессии CBS и к увеличению синтеза  $H_2S$  в мозге. Было показано, что у людей с этим заболеванием в моче увеличена концентрация тиосульфата, продукт метаболизма  $H_2S$  (Belardinelli, Chabli, 2001). По-видимому, избыток  $H_2S$  оказывал токсичное воздействие на нейроны посредством ингибирования цитохромоксидазы и/или гиперстимуляцией НМДА-рецепторов и, таким образом, вносил свой вклад в прогрессивную олигофрению у больных с 21 трисомией (Kamoun, 2004).

$H_2S$  оказывает неоднозначное действие на протекание ишемического инсульта (инфаркта мозга). Аппликация NaHS или L-цистеина ухудшало течение заболевания, тогда как ингибиторы CBS или CSE снижали объем мозгового инфаркта, вызванного односторонней окклюзией средней мозговой артерии. (Qu et al., 2006). При этом концентрация  $H_2S$  в коре головного мозга увеличилась, что предполагает негативное влияние  $H_2S$  при ишемическом инсульте. Однако, есть также данные указывающие на позитивное влияние  $H_2S$  (Lowicka, 2007, Qu et al., 2008; Li, 2008). Так,  $H_2S$  предотвращал нейротоксические эффекты глутамата (ишемия мозга, травмы и т.д.), не связанные с гиперстимуляцией глутаматных рецепторов. (Lowicka, 2007; Qu

et al., 2008). Оказалось, что NaHS стимулировал активность  $\text{Xc}^-$  транспортера (цистин-глутамат антитпорта), повышая внутриклеточный уровень цистеина, и, таким образом, проявлял защитный эффект против глутамат-вызванной нейротоксичности (Eto, Kimura, 2002). NaHS увеличивал внутриклеточную концентрацию глутатиона в культурах нейронов крыс и в контрольных условиях, и при аппликации глутамата, проявляя защитный эффект (Kimura et al., 2006).

Защитное влияние  $\text{H}_2\text{S}$  на нейроны мозга при ишемическом инсульте и глутаматной интоксикации также может быть связано с активацией АТФ-зависимых  $\text{K}^+$ -каналов (Kimura, Dargusch, 2006). Другой механизм, с помощью которого  $\text{H}_2\text{S}$  проявляет защитный эффект – это его антиоксидантное действие.  $\text{H}_2\text{S}$  – очень реактивная молекула и может легко вступить в реакцию с другими соединениями, особенно с активными формами кислорода и азота. Показано, что  $\text{H}_2\text{S}$  реагирует по крайней мере с четырьмя различными активными радикалами – перекисным радикалом (Mok et al., 2004), перекисью водорода (Geng et al., 2004), пероксинитритом ( $\text{ONOO}^-$ ) (Whiteman et al., 2004) и гипохлоритом (Whiteman, Cheung, Zhu, 2005). Все эти соединения очень активны, и их взаимодействие с  $\text{H}_2\text{S}$  приводит к защите белков и липидов от ROS/RNS-опосредованных повреждений (Whiteman et al., 2004; Whiteman, Cheung, Zhu, 2005). Значимость реакции  $\text{H}_2\text{S}$  с  $\text{O}_2^-$  неоднозначна, так как продукт реакции, сульфит, может обладать как токсическими (Collin, Thiemermann, 2005), так и антиоксидантными свойствами (Kimura et al., 2006), что, по-видимому, зависит от его концентрации.

Следовательно,  $\text{H}_2\text{S}$  может проявлять как отрицательные, так положительные эффекты при патологиях нервной системы. Было показано, что уровень  $\text{H}_2\text{S}$  у больных болезнью Альцгеймера на  $\sim 55\%$  меньше по сравнению с контрольными группами (Eto et al., 2002). При этом никаких изменений уровня цистеина или уменьшения экспрессии гена CBS обнаружено не было. Оказалось, что дефицит  $\text{H}_2\text{S}$  вызван изменением уровня активатора CBS – S-аденозилметионина, концентрация

которого в тканях мозга пациентов с болезнью Альцгеймера на ~70 % меньше, чем в контрольной группе (Eto et al., 2002). Как было описано выше, H<sub>2</sub>S проявляет антиоксидантные свойства и его дефицит может привести к увеличению концентрации пероксинитритов и гипохлоритов у пациентов с болезнью Альцгеймера. Кроме того, H<sub>2</sub>S является вазорелаксантом, поэтому уменьшение уровня H<sub>2</sub>S, вероятно, вызывает дисфункцию микроциркуляторного русла мозга, приводящую к возникновению болезни Альцгеймера (Moore et al., 2003).

Таким образом, из представленных данных видно, что сероводород может генерироваться во многих типах клеток, регулировать целый ряд физиологических функций, действуя на специфические мишени. Эндогенный метаболизм и физиологические эффекты позволяют отнести сероводород к семейству газообразных посредников или «газомедиаторов» (Wang 2003). Показано, что в гладких мышцах сосудов сероводород оказывает расслабляющее действие, а в центральной нервной системе участвует в индукции долговременной потенциации. Несмотря на уже имеющиеся данные о влияние NO и CO на освобождение медиатора из двигательных нервных окончаний, исследований влияния сероводорода на нервно-мышечную передачу теплокровных не проводилось.

## 1.6 Основные характеристики рианодиновых рецепторов

В настоящее время из мембранный фракции гладкого эндоплазматического ретикулума (ГЭР) нервной и мышечной тканей выделены несколько разновидностей специализированных внутриклеточных кальциевых каналов. Одними из наиболее изученных типов таких каналов являются кальций-активируемые Ca<sup>2+</sup>-каналы, называемые рианодиновыми рецепторами (Ри-рецепторы), благодаря высокоаффинному связыванию с растительным алкалоидом рианодином (Балезина, 2002, Рубцов, Батрукова, 1997; Coronado et al., 1994; Sitsapesan, McGarry, Williams, 1995; Zucchi, Ronca-Testoni, 1997). В нервных терминалях синапсов имеется пул микросом,

аналогичных цистернам ГЭР (Pozzan et al., 1994). В конце 80-х годов было показано, что аккумулирующие кальций цистерны и трубочки, являющиеся продолжением ГЭР, встречаются не только в телах нейронов, но и в их отростках, включая дендриты и нервные терминали аксонов (Henzi, MacDermott, 1992; McGraw, Somlyo, Blaustein, 1980).

В составе внутриклеточных мембран молекулы Ри-рецепторов (РиР) группируются в тетramerные комплексы. Мономер РиР - это трансмембранный полипептид с молекулярной массой около 500 кДа. При взаимодействии с кальцием (0,5-5,0 мкМ) или  $Mg^{2+}$ -АТФ (1-5 мМ) Ри-рецептор способен образовывать  $Ca^{2+}$ -канал, по которому  $Ca^{2+}$  поступает из полости ретикулума в цитоплазму (Рубцов, Батрукова, 1997; Berridge, Irvine 1984; Sitsapesan, McGarry, Williams, 1995; Meissner, 1994). Незначительное повышение уровня кальция будет активировать  $Ca^{2+}$ -канал РиР, а повышение уровня  $[Ca^{2+}]_0$  выше 10-50 мкМ будет приводить к инактивации  $Ca^{2+}$ -канала Ри-рецептора и прекращению выброса  $Ca^{2+}$  из цистерн ГЭР. Активность рианодиновых рецепторов коррелирует с количеством свободных сульфогидрильных групп, при этом окисляющие агенты увеличивают, тогда как восстанавливающие агенты ингибируют активность канала (Hidalgo et al., 2004).

В настоящее время охарактеризованы три разновидности молекул Ри-рецепторов - РиР<sub>1</sub>, РиР<sub>2</sub> и РиР<sub>3</sub>, все они имеются в нервной ткани, хотя представленность каждой из изоформ может колебаться в зависимости от типа нервной клетки. Ряд данных позволяет считать, что наиболее распространенным в ЦНС является РиР<sub>2</sub> тип (Henzi, MacDermot, 1992). В настоящее время известно, что РиР<sub>1</sub> и РиР<sub>2</sub> активируются (помимо кальция и АТФ) рианодином и кофеином, однако различаются чувствительностью к дантролену, который инактивирует лишь РиР<sub>1</sub>, но не затрагивает РиР<sub>2</sub> (Zhao et al., 2001). РиР<sub>3</sub> изоформа активируется ионами кальция, рианодином (в наносубмикромолярном диапазоне), но не чувствительна к действию кофеина; РиР<sub>3</sub> можно заблокировать дантроленом (Zhao et al., 2001). Также к числу эндогенных активаторов и/или модуляторов Ри-рецептора  $Ca^{2+}$ -канала

относятся нуклеотиды (АМФ, АДФ, ц-АМФ), а также аденоzin и циклическая АДФ-рибоза (Балезина, 2002). Показано, что фосфорилирование протеин киназой А приводит к увеличению вероятности открытия и времени открытого состояния канала рианодинового рецептора (Ruehr et al., 2003; Takasago et al., 1989; Hain et al., 1995)

Тетramer Ри-рецептора является одним из самых сложно и многообразно регулируемых рецепторно-канальных комплексов клетки, известных в настоящее время. Растительный алкалоид рианодин может оказывать двунаправленное действие на молекулу Ри-рецептора. Связываясь с ней в участке с высоким сродством (5-10 нМ) рианодин приводит к удержанию  $\text{Ca}^{2+}$ -канала Ри-рецептора в открытом, но низкопроводящем состоянии. При взаимодействии с молекулой Ри-рецептора в высоких концентрациях (5-30 мкМ) рианодин вызывает блокаду  $\text{Ca}^{2+}$ -канала Ри-рецептора (Ehrlich et al., 1994; Sitsapesan, McGarry, Williams, 1995). Кофеин при связывании с Ри-рецептором во-первых, сенсибилизирует молекулу Ри-рецептора к ионам кальция, и во-вторых, способен сам открывать кальциевый канал Ри-рецептора, приводя к выбросу  $\text{Ca}^{2+}$  из цистерн эндоплазматического ретикулума (Рубцов, Батрукова, 1997; Ehrlich et al., 1994; Sitsapesan, McGarry, Williams 1995).

К числу блокаторов  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов Ри-рецептора относятся ионы магния (1-5мМ), рианодин (в концентрациях 10-50мкМ), прокаин (1-5мкМ) и рутений красный (1мкМ) (Балезина, 2002; Meissner, 1994; Рубцов, Батрукова, 1997).

## 1.7 Роль рианодиновых рецепторов в секреции медиатора

Впервые участие Ри-рецепторов в регуляции синаптической передачи было обнаружено в постсинаптических структурах центральных синапсов.

Активация Ри-рецепторов - при определенных условиях, например кофеином, - может увеличивать внутриклеточный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, уровень спонтанной и вызванной секреции квантов ацетилхолина (АХ) (Narita et al.,

2000; Балезина, 2002; Балезина, Букия, 2005; Зефиров, Абдурахманов, 2005).

Однако во многих возбудимых структурах - в соме нейронов, в сердечных, гладкомышечных и других клетках выброс  $\text{Ca}^{2+}$  из цистерн ГЭР способен играть двоякую роль: как усилителя внутриклеточного кальциевого сигнала, так и его ограничителя - путем торможения входящего в клетку потока наружного кальция (Liang et al., 2002; Flink, Atchison, 2003). Тормозный эффект обычно обусловлен вовлечением  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых  $\text{K}^+$ -каналов либо инактивацией  $\text{Ca}^{2+}$  каналов наружной мембранны за счет прицельного действия на них кальция, высвобождаемого из примембранных цистерн ГЭР (Urbano et al., 2001; Bondarenko et al., 2004). Какой из противоположных эффектов будет преобладать (облегчение либо торможение  $\text{Ca}^{2+}$  сигнала), зависит от числа и типа активируемых РиР, потока входящего кальция и ряда других причин (Kuba, 1994; Sah, McLachlan, 1991; Akita et al., 2000; Bondarenko et al., 2004).

## 1.8 Аденилатциклазный путь передачи информации в нервной системе

Клетка может реагировать на изменение окружающей среды запуском метаболических сигнальных путей и синтезом вторичных посредников. Мембранонепроникающие сигнальные молекулы взаимодействуют с рецепторами, локализованными в плазматической мембране клетки. Такое взаимодействие приводит к изменению активности ферментов, связанных с рецепторами, и фосфорилированию белков.

Циклический 3`5`-аденозинмонофосфат (цАМФ) - первое соединение, которое открывшие его Е. Сазерленд и др. (Sutherland et al, 1958) назвали "вторичным посредником". цАМФ содержит в своей структуре необычное фосфатное кольцо с энергобогатой 3`-связью. Изменения свободной энергии при гидролизе цАМФ составляет около 12 ккал. Это свидетельствует, что 3`-терминальная фосфатная связь цАМФ является одной из наиболее высоко

энергозаряженных метаболически доступных связей, что лежит в основе активирования фосфокиназ (Туракулов и др., 1983; Hanoune et al, 1997).

В головном мозге высокая активность аденилатциклазы наблюдается в сером веществе коры больших полушарий, наиболее низкая - в белом веществе полушарий и мозжечка. Установлено, что ферменты адениловой системы локализуются преимущественно в пресинаптических или постсинаптических мембранах.

Внутриклеточный уровень цАМФ в тканях млекопитающих в нормальных условиях при отсутствии гормональной стимуляции составляет  $10^{-7}$  М. При действии нейромедиаторов или гормонов внутриклеточное содержание цАМФ резко увеличивается. Внутриклеточная концентрация цАМФ находится под контролем двух противоположно направленных действий и опосредуется относительной активностью аденилатциклазы, образующей цАМФ из АТФ, с одной стороны, и фосфодиэстеразы (ФДЭ), разрушающей циклический нуклеотид с образованием 5`АМФ - с другой.

Аденилатциклаза (АЦ), ключевой фермент аденилатциклазного пути передачи сигнала обнаруженный во всех типах клеток. Показано, что АЦ является интегральным мембранным белком, полипептидная цепь которого имеет 12 гидрофобных трансмембранных сегментов, образованных 20-22 аминокислотами каждый (Ашмарин, Стукалова, 1996; Крутецкая и др., 2003). В настоящее время клонировано девять изоформ аденилатциклазы разделенные на четыре группы. Первая группа (АЦ 1, 3, 8) стимулируется кальмодулином и ионами кальция. АЦ второй группы фосфорилируется протеинкиназой С (АЦ 2, 4, 7). Третья группа (АЦ 5, 6) ингибируется ионами кальция в низкой концентрации, а четвертая (АЦ 9) нечувствительна к ним. АЦ широко распространена во всех тканях всех видов животных, бактерий и других одноклеточных организмов. Все типы АЦ состоят из короткого N-терминального региона, двух длинных цитоплазматических доменов (C1 и C2) и двух гидрофобных участков (M1, M2), каждый из которых состоит из шести трансмембранных доменов. Различные изоформы АЦ могут

регулироваться субъединицами G-белков, комплексом кальмодулин–кальций, аденоzinом (Р-сайт). Регуляция осуществляется также за счет фосфорилирования фермента протеинкиназой А и С (Hanoune et al, 1997). В нервных клетках гиппокампа и мозжечка деполяризующие агенты (KCl, вератридин) активируют АЦ.

Для исследования работы систем вторичных посредников применяют аналоги циклических нуклеотидов, так как сами циклические нуклеотиды не способны проникать через плазматическую мембрану клетки и быстро расщепляются фосфодиэстеразой. Для активации протеинкиназы А (ПКА) и увеличения концентрации цАМФ в клетке используют следующие вещества: дб-цАМФ, 8Br-цАМФ, 8-Cl-цАМФ, 8-метиламино-цАМФ и другие производные цАМФ, различающиеся по липофильности, резистентности к действию фосфодиэстераз и способности к стимуляции протеинкиназ. Так часто используемые аналоги цАМФ - дб-цАМФ, 8Br-цАМФ селективно активируют ПКА, но только в два раза лучше проходят через мембрану по сравнению с цАМФ, а дб-цАМФ быстрее подвергается гидролизу фосфодиэстеразами, чем 8Br-цАМФ (Shugar, 2000).

Большая группа ферментов, объединенная под названием «протеинкиназы», катализирует перенос концевого остатка фосфата с АТФ на различные группы в структуре белка. Протеинкиназы разделяются на пять больших классов в зависимости от того, на какие группы в структуре белка переносится остаток фосфата. Гетероолигомерная протеинкиназа или цАМФ-зависимая протеинкиназа опосредует большинство биологических эффектов цАМФ во всех клетках эукариот (Francis, Corbin, 1994, Крутецкая и др., 2003). Однако, в скелетных мышцах крысы цАМФ ингибирует Na-каналы без активации ПКА и фосфорилирования субъединиц канала (Bloomer, 1998).

ПКА в клетке в отсутствие цАМФ находится в неактивном холоферментном комплексе из димерных регуляторных (R) и мономерных каталитических субъединиц (C). По аминокислотной последовательности R-субъединицы выделяют два типа цАМФ-зависимых протеинкиназ (I и II).

Активация холоэнзима ПКА зависит от связывания двух молекул цАМФ с каждой R-субъединицей и последующей диссоциацией C-субъединицы. Концентрация ПКА в клетках млекопитающих достаточно высока (0.2-2 мкМ) и достаточна, чтобы связать практически весь синтезируемый цАМФ и сделать его недоступным для гидролиза ФДЭ. Однако, при диссоциации комплекса связывание цАМФ с регуляторной субъединицей ослабевает, цАМФ диссоциирует и становится доступной для ФДЭ, активность которой усиливается фосфорилированием ПКА. Возврат системы в исходное неактивное состояние происходит после дефосфорилирования белка соответствующими фосфатазами. ПКА обнаружена во всех животных клетках. К настоящему времени известно несколько десятков ферментов, активность которых регулируется *in vivo* и *in vitro* за счет фосфорилирования ПКА. После освобождения C-субъединицы могут фосфорилировать различные белки-субстраты (Shugar, 2000), а именно различные протеинкиназы и фосфатазы, ферменты, участвующие в синтезе и распаде белков, жиров и углеводов, белковые комплексы эндоцитозного аппарата, канальные субъединицы, АЦ (механизм обратной связи) и гуанилаткиназу, специальные факторы, участвующие в синтезе белка на рибосомах. Обнаружено, что субстратами ПКА являются многие ядерные белки, в том числе гистоны; одна из фракций миорных белков микротрубочек мозга (MAP-2); ряд мембранных белков мозга;  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза и фосфоламбан в саркоплазматическом ретикулуме и многие другие (Mittal et al, 1979; Schenk, Snaar-Jagalska, 1999; Shugar, 2000; Гусев, 2000).

Фосфорилирование белков является одним из основных способов передачи сигналов, контролирующих различные клеточные процессы. В соответствии с этим, активность протеинкиназ должна жестко регулироваться. Одним из уровней регуляции является определенная субклеточная локализация киназ путем взаимодействия их с определенными «заякоривающими белками» (AKAPs). Такое взаимодействие ведет к быстрой и избирательной модуляции специфических мишней в ответ на повышение

концентрации вторичных мессенджеров в определенных микродоменах клетки.

### 1.9 цАМФ/ПКА в нервно-мышечном синапсе

Известно, что цАМФ играет важную роль в секреции медиатора (Coldberg, Singer, 1969). В нервно-мышечном препарате *Drosophila melanogaster* и в нейронах Пуркинье мозга крыс рост концентрации ионов кальция в цитоплазме двигательного НО и активация ПКА приводили к увеличению спонтанного выброса медиатора (Chen, Regehr, 1997; Wildemann, Bicker, 1999b; Yoshihara et al, 2000).

На фибробластах мыши, полученных из клеточной линии L-M [TK], показано, что аналоги цАМФ увеличивали квантовый состав вызванной секреции медиатора (Yewei, Martin, 1997). Установлено, что добавление 8Br-цАМФ, активаторов аденилатциклазы (IBMX, SQ20009) и ингибитора фосфодиэстеразы - теофиллина увеличивало частоту МПКП и квантовый состав ПКП гемидиафрагмальной мышцы крысы (Dryden et al, 1988). Такое же увеличение секреции наблюдали при действии цАМФ на мускариновые синапсы в симпатическом ганглии кролика (Kobayashi, 1982).

цАМФ/ПКА участвуют в экзоцитозе медиатора и регулируют концентрацию ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , синтез, транспортировку и заполнение медиатором везикул в нервной терминали (Standaert, Dretchen, 1979, Dryden et al, 1988, Chavis et all., 1998).

Показано, что в нервных клетках комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин стимулирует аденилатциклазу, что должно потенцировать цАМФ-опосредованные реакции (Теппермен, Теппермен, 1989, Реутов и др., 1998). Эти данные свидетельствуют о функциональной зависимости между двумя вторичными посредниками - цАМФ и  $\text{Ca}^{2+}$ , а также между двумя системами - аденилатциклазной и системой мобилизации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (Реутов и др., 1998).

Установлено, что цАМФ и его аналоги в ооцитах лягушек рода *Xenopus* могут напрямую регулировать пресинаптические кальциевые каналы N- и Q- типа (Miller, 1990; Kaneko et al, 1998). Добавление дб-цАМФ в миоциты вызывало увеличение  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительного  $\text{K}^+$ -тока (Porter et al, 1998, Cheung et al, 1999), рост внутриклеточной концентрации ионов кальция в цитоплазме клетки (Keller et al, 1988). В нервно-мышечном синапсе лягушки аналоги циклических нуклеотидов вызывали увеличение вызванной и спонтанной секреции медиатора (Goldberg, Singer, 1969; Van der Kloot, Molgo, 1994; Бухараева и др., 2000).

Таким образом, из литературных данных видно, что в эффектах многих нейромедиаторов участвует аденилатциклазная система передачи сигналов, которая стимулирует протеинкиназные реакции и фосфорилирование белков экзоцитозного аппарата и ионных каналов.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

## 2.1 Объекты, методы и оборудования

### 2.1.1 Экспериментальная ванночка и система перфузии

Ванночка (рис 2), где размещался нервно-мышечный препарат диафрагмальной мышцы мыши, была изготовлена из органического стекла и имела рабочий объем 5 мл и к ней была подсоединенна перфузационная система. Емкость перфузационной системы состояла из основного стаканчика (емкостью 30 мл), соединенного поливиниловыми трубками с ванночкой таким образом, что скорость перфузии в течение эксперимента была постоянной. Все эксперименты выполнены в условиях постоянной наружной перфузии препарата раствором Кребса для теплокровных животных (в мМ): NaCl - 154; KCl – 5; CaCl<sub>2</sub> – 2; HEPES – 5, MgCl<sub>2</sub> – 1, глюкоза - 11 (t=20±0.5°C, pH 7.2-7.4). Для устранения сокращения мышц в раствор добавляли d-тубокуарин (20-30 мкМ).

Из ванночки растворы откачивали активно с использованием микрокомпрессора. Нерв всасывали в пластмассовую пипетку, укрепленную в стенке ванночки, где были расположены два серебряных раздражающих электрода.

В качестве донора H<sub>2</sub>S использовали гидросульфид натрия (NaHS), так как в водных растворах он диссоциирует до иона натрия (Na<sup>+</sup>) и гидросульфидного аниона (HS<sup>-</sup>), который реагируя с протоном (H<sup>+</sup>), образует H<sub>2</sub>S. Известно, что в физиологическом растворе одна треть H<sub>2</sub>S находится в недиссоциированной форме, а остальные две трети существуют в виде HS<sup>-</sup>. Использовали субстрат синтеза H<sub>2</sub>S – L-цистein, блокаторы синтеза H<sub>2</sub>S - β-цианоаланин и аминооксиацетиловую кислоту (AOAK), кофеина, блокатор фосфодиэстераз (IBMX – 3-Isobutyl-1-methylxanthine), блокатор аденилатциклазы (MDL 12,330A hydrochloride) и аналог цАМФ(8-(4-chlorophenylthio)-adenosine 3':5'-cyclic monophosphate) все вещества фирмы Sigma (США).

## 2.1.2 Изготовление, заполнение и подведение микроэлектродов

Для регистрации токов концевой пластиинки (ТКП) – вызванной секреции медиатора и миниатюрных токов концевой пластиинки (МТКП) – спонтанной секреции медиатора использовали стеклянные микроэлектроды из стекла «Пирекс» (Костюк, 1960). Электроды изготавливали на полуавтоматической вертикальной кузнице из специальных заготовок. Изготовление и заполнение электродов производили непосредственно перед экспериментом (Казанский, 1973).

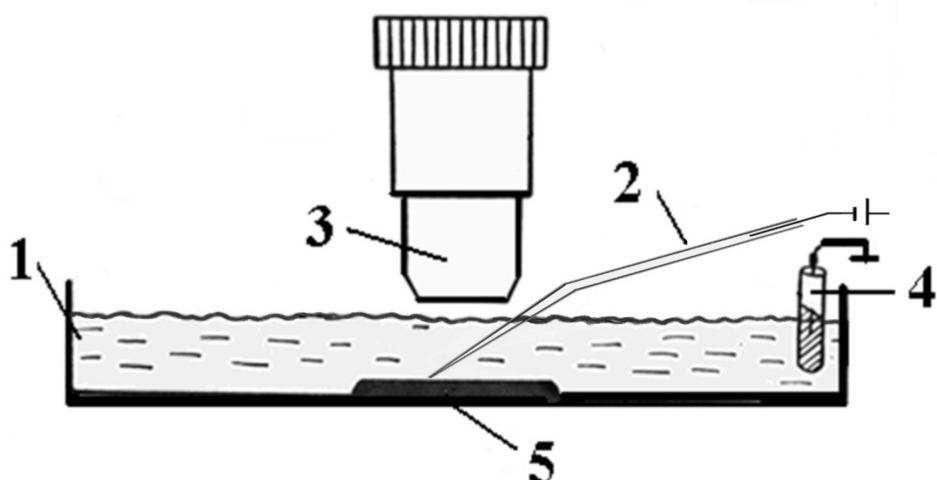


Рисунок 2 - Схематическое изображение ванночки с подведенным микроэлектродом и объективом микроскопа: 1) – пластиковая ванночка с раствором Крепса; 2) – стеклянный электрод с 2 М NaCl; 3) – микроскоп; 4) – индифферентный электрод; 5) – нервно-мышечный препарат

Микроэлектроды с диаметром кончика 2-3 мкм имели сопротивление 2-5 МΩ. Микроэлектрод закрепляли на специальном держателе и соединяли с усилителем. Для этого непосредственно в микроэлектрод вводили тонкую серебряную хлорированную проволоку. Индифферентный электрод представлял собой аналогичную неполяризующуюся систему без микроэлектрода, который помещали в специальное гнездо ванночки,

сообщающееся с основной камерой. Держатели активных электродов закрепляли в микроманипуляторах.

Основную часть экспериментов выполняли с использованием оптической системы на базе микроскопа МБС-2.

### 2.1.3 Регистрация биопотенциалов

Раздражение двигательного нерва производили прямоугольными электрическими импульсами сверхпороговой амплитуды длительностью 0,16 мс одиночными стимулами с частотой 0,2 имп/с.

Стимулирующие электроды соединяли с выходными клеммами изолирующего трансформатора электростимулятора ЭСЛ-2. Активный потенциальный и индифферентный электроды соединяли с усилителем биопотенциалов. С усилителя сигнала параллельно подавался на осциллограф С1-83 и на персональный компьютер через АЦП ЛА-2 USB.

Накопление и усреднение вызванных сигналов производили при помощи персонального компьютера с использованием оригинальной программы «Elph» позволяющей рассчитать амплитуду сигналов, время роста и время спада (автор программы – Захаров А. В.).

При внеклеточном отведении микроэлектрод, заполненный раствором NaCl (2M), подведенный к двигательному нервному окончанию, при стимуляции нерва регистрирует электрический ответ нервному окончанию и последующий за ним постсинаптический сигнал – ток концевой пластинки (ТКП) (Katz, Miledi, 1967). При внеклеточном отведении амплитуды ТКП усреднялись по 12 реализациям. Анализировали амплитуду, время нарастания (RT), время полуспада ( $\tau$ ) и частоту МТКП.

### 2.1.4 Статистическая обработка экспериментальных данных

При статистической обработке экспериментальных данных использовали программу «Origin 8.5», с помощью которой вычисляли средние величины и стандартную ошибку. Достоверность различий между популяциями оценивали по t-критерию Стьюдента. Использовали уровень значимости отличий между двумя популяциями равный 0,05 (Лакин, 1984).

## 2.2 Результаты исследований и их обсуждение

### 2.2.1 Эффект NaHS на вызванную и спонтанную секрецию

Аппликация донора  $H_2S$  - NaHS (300 мкМ) в перфузируемый раствор Крепса приводила к быстрому и обратимому увеличению вызванной секреции медиатора. Наблюдалось увеличение амплитуды ТКП, которое к 10 минуте эксперимента достигло  $137,2 \pm 5,1$  % ( $n=6$ ;  $p<0,05$ ) относительно контроля (Рис. 3).

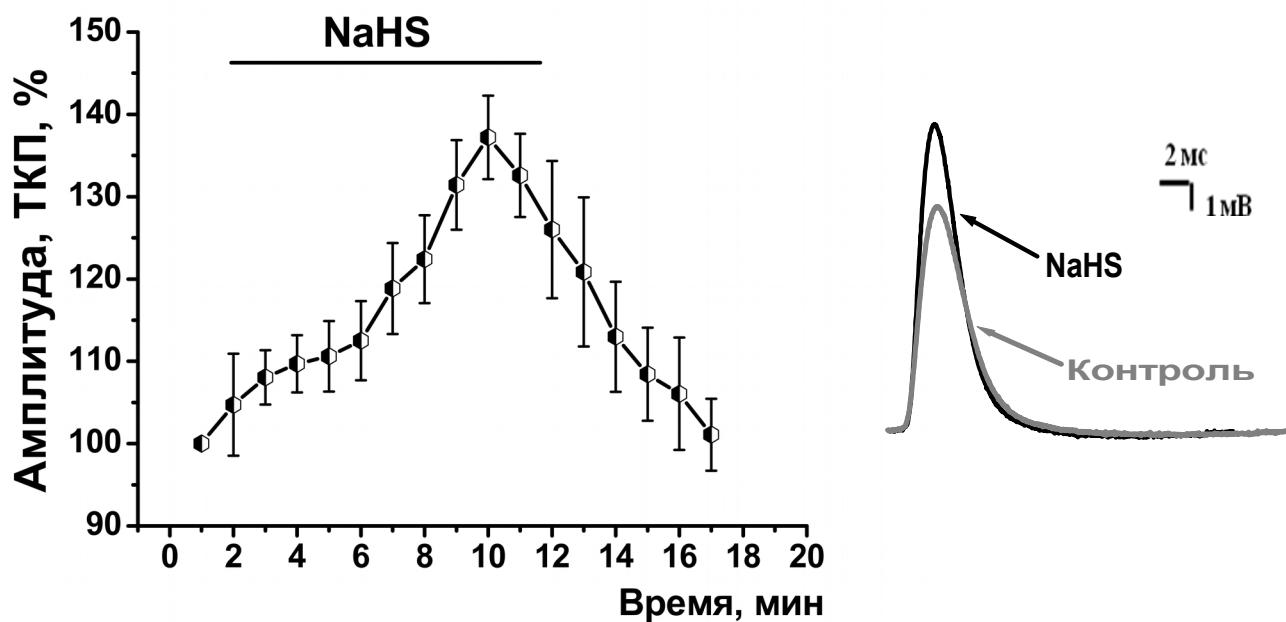


Рисунок 3 - Эффект NaHS (300 мкМ) на вызванную секрецию медиатора в нервно-мышечном синапсе мыши (слева); пример ТКП в контроле и при действии NaHS (справа)

При этом наблюдали увеличение частоты МТКП до  $210,1 \pm 42,5$  % (n=4; p<0,05) (Рис. 4 а, б) относительно контроля к 15 минуте эксперимента. Амплитудно-временные характеристики МТКП в присутствии NaHS достоверно не изменились: в контроле средняя амплитуда МТКП составила  $0,43 \pm 0,01$  мВ, RT= $0,50 \pm 0,06$  мс,  $\tau=1,06 \pm 0,14$  мс, а после добавления NaHS средняя амплитуда МТКП составила  $0,41 \pm 0,01$  мВ, RT= $0,50 \pm 0,05$  мс,  $\tau=1,01 \pm 0,10$  мс (n=4, p>0,05).

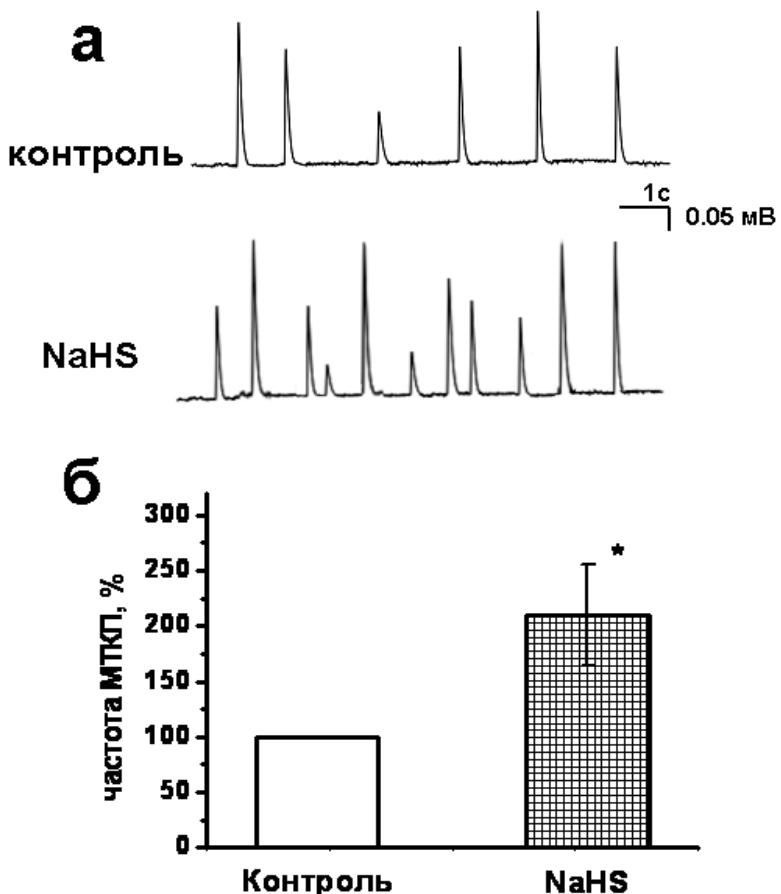


Рисунок 4 - Влияние NaHS (300 мкМ) на спонтанные токи концевой пластиинки в нервно-мышечном синапсе мыши: а) - миниатюрные токи концевой пластиинки в контроле и при действии NaHS (отдельный эксперимент); б) - изменение частоты МТКП при действии NaHS

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что экзогенный H<sub>2</sub>S оказывает облегчающее влияние на спонтанное и вызванное освобождение

медиатора в нервно-мышечном синапсе диафрагмальной мышцы мыши. Анализ влияния  $H_2S$  на спонтанную секрецию медиатора показал увеличение частоты МТКП без изменения их амплитудно-временных параметров, что свидетельствует об отсутствии влияния газа на чувствительность постсинаптических холинорецепторов. Подобный эффект мы наблюдали и в нервно-мышечном синапсе кожно-грудинной мышцы лягушки (Gerasimova et al., 2008), по-видимому,  $H_2S$  имеет сходные молекулярные мишени действия как у холоднокровных, так и теплокровных животных. Увеличение освобождения медиатора может быть связано с изменением электрогенеза двигательного нервного окончания и усилением входящего кальциевого тока, тем более, что из литературных данных известно, что целый ряд клеточных эффектов  $H_2S$  опосредуются его влиянием на активность ионных каналов, ткане- и видоспецифичным образом. Так, гипералгезия, вызванная аппликацией  $NaHS$ , может быть связана с активацией T-типа  $Ca^{2+}$ -каналов в первичных афферентных нейронах у крысы (Kawabata et al., 2007).  $H_2S$  ингибирует L-тип  $Ca$ -каналов в кардиомиоцитах, но в то же время активирует L-тип  $Ca^{2+}$ -каналов в нейронах, регулируя таким образом концентрации ионов кальция в клетке (Garcia-Berenguain et al., 2008). Кроме того, показано, что  $H_2S$  может влиять на работу  $Ca$ -активируемых калиевых каналов, как усиливая их активность в культуре GH3 клеток крысы (Siddikova et al., 2010), так и ингибируя в клетках HEK 293, экспрессирующих  $\alpha$  субъединицу каналов (Telezhkin et al., 2009).

В двигательной нервной терминали лягушки не обнаружено изменений параметров ответа нервного окончания при действии  $H_2S$  (Gerasimova et al., 2008), однако, нельзя исключать влияния газа на ионные каналы у теплокровных животных. Возможно также, что  $H_2S$  непосредственно вмешивается в механизмы экзоцитоза синаптических везикул, связанные с трансформацией белков SNARE-комплекса, о чем свидетельствует увеличение частоты МТКП. Известно, что в водных растворах  $H_2S$  обладает свойствами восстановителя (Wang, 2002) и способен восстанавливать дисульфидные связи белковых молекул (Qu et al., 2008). Можно предположить, что  $H_2S$  приводит к изменению окислительно-восстановительного статуса SNARE

комплекса, что влияет на стабильность белковых взаимосвязей (Duman et al., 2003; LoPachin et al., 2006). Кроме того, H<sub>2</sub>S может усиливать синтез цАМФ в нейрональных клетках (Kimura et al., 2000).

## 2.2.2 Влияние субстрата и блокаторов синтеза H<sub>2</sub>S на вызванное освобождение медиатора

Субстрат эндогенного синтеза H<sub>2</sub>S в тканях - L-цистein в концентрации 1 мМ к 15 минуте увеличивал амплитуду ТКП до 112±1,4% (n=4; p<0,05) по отношению к контролю (Рис. 5).

Для блокирования фермента синтеза H<sub>2</sub>S CSE использовали β-циано-L-аланин (β-ЦА) в концентрации 1 мМ. Аппликация β-ЦА на нервно-мышечный препарат к 30 минуте приводила к уменьшению амплитуды ТКП до 45,3±14,2 % (n=6; p<0,05) по отношению к контролю (Рис. 5). Для блокирования CBS использовали аминооксиацетиловую кислоту (АОАК) в концентрации 1 мМ. Добавление АОАК к 30 минуте уменьшало амплитуду ТКП до 12,4±9,1% (n=5 p<0,05) относительно контроля (Рис. 5). Таким образом, блокирование ферментов синтеза H<sub>2</sub>S - CBS и CSE приводило к уменьшению вызванной секреции медиатора из двигательного нервного окончания мыши, эффектам противоположным действию NaHS и L-цистеина.

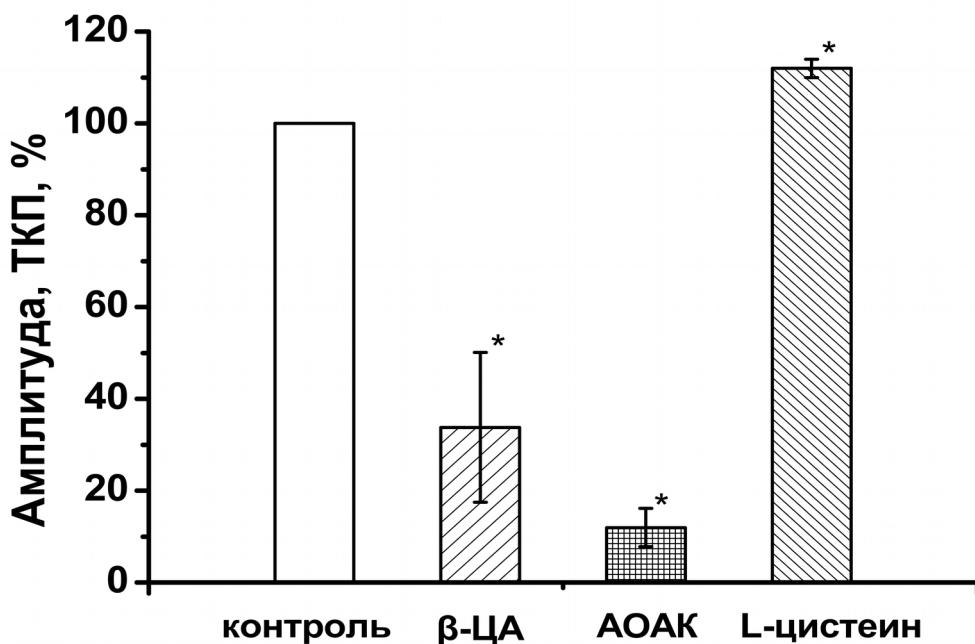


Рисунок 5 - Эффекты блокаторов ферментов синтеза -  $\beta$ -циано-L-аланина (1мМ) и аминооксиацетиловой кислоты (1мМ) и субстрата эндогенного синтеза сероводорода - L-цистеина (1мМ)

Из литературных данных известно, что эндогенно  $\text{H}_2\text{S}$  может синтезироваться из L-цистеина ферментами CBS и CSE (Zhao et al., 2001; Abel et al., 1996; Hosoki, 1997). Серосодержащие аминокислоты являются главными источниками эндогенного синтеза  $\text{H}_2\text{S}$ . Во внеклеточной жидкости цистеин, в основном, присутствует в виде димера - цистина. Цистеин и цистин имеют специфические транспортные системы для переноса через плазматическую мембрану, увеличение внеклеточного уровня цистеина ведет к росту его внутриклеточной концентрации (Lu, 1999). Концентрация цистина в плазме составляет 100–200 мкМ, а цистеина - около 10–20 мкМ (Kamoun, 2004). L-цистеин в концентрации более 1 мМ обычно используется в качестве субстрата синтеза  $\text{H}_2\text{S}$  в различных исследованиях, в связи с тем, что CBS и CSE имеют низкую аффинность к цистеину (Dominy et al., 2004). В наших экспериментах L-цистеин в концентрации 1 мМ приводил к увеличению вызванного освобождения медиатора, эффект аминокислоты был

незначительный, что, по-видимому, связано с высоким эндогенным уровнем L-цистеина в ткани.

Цистатионин  $\gamma$ -лиаза, фермент широко экспрессирующийся в печени, почках, гладкомышечной ткани (Lu et al., 1992; Yap et al., 2000; Abe et al., 1996; Zhao et al., 2001), а экспрессия цистатионин  $\beta$ -синтазы показана в нервной системе, печени и почках (Hosoki et al., 1997; Meier et al., 2001; Wang, 2002).

Ранее нашей лабораторией с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией была показана специфическая экспрессия мРНК CSE и CBS в области нервно-мышечного синапса диафрагмальной мышцы мыши. Нельзя исключить также наличия ферментов в нервных окончаниях, Шванновских клетках или гладкомышечных клетках сосудов, также присутствующих в исследуем образце, несмотря на преобладание массовой доли мышечной ткани. В любом случае, наличие ферментов предполагает возможный синтез  $H_2S$  в области нервно-мышечного синапса. На это указывают и эксперименты с блокаторами CSE и CBS -  $\beta$ -цианоаланином и аминооксиацетиловой кислотой, которые снижали вызванное освобождение медиатора, что противоположно действию  $H_2S$  и L-цистеина. Синтез  $H_2S$  регулируется как на уровне экспрессии ферментов CSE и CBS в тканях, так и путем изменения их активности (Eto et al., 2002; Chaudhari et al., 2007).

### 2.2.3 Действие NaHS на фоне кофеина и блокатора фосфодиэстераз

Агонист рианодиновых рецепторов – кофеин в концентрации 1 мМ к 25 минуте увеличивал амплитуду ТКП до  $183,6 \pm 17,9$  % (n=8; p<0,05) по отношению к контролю (рис. 6). На фоне кофеина эффект сероводорода не проявлялся, при этом амплитуда ТКП через 5 минут после его аппликации составляла  $107,8 \pm 3,1$  % (n=4; p>0,05) по отношению к контролю (рис. 6). В условиях блокирования фосфодиэстераз с помощью IBMX (3-Isobutyl-1-

methylxanthine) эффект  $\text{H}_2\text{S}$  сохранялся и к 9 минуте амплитуда ТКП достигала  $137 \pm 8\%$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ) относительно контроля (рис.6).

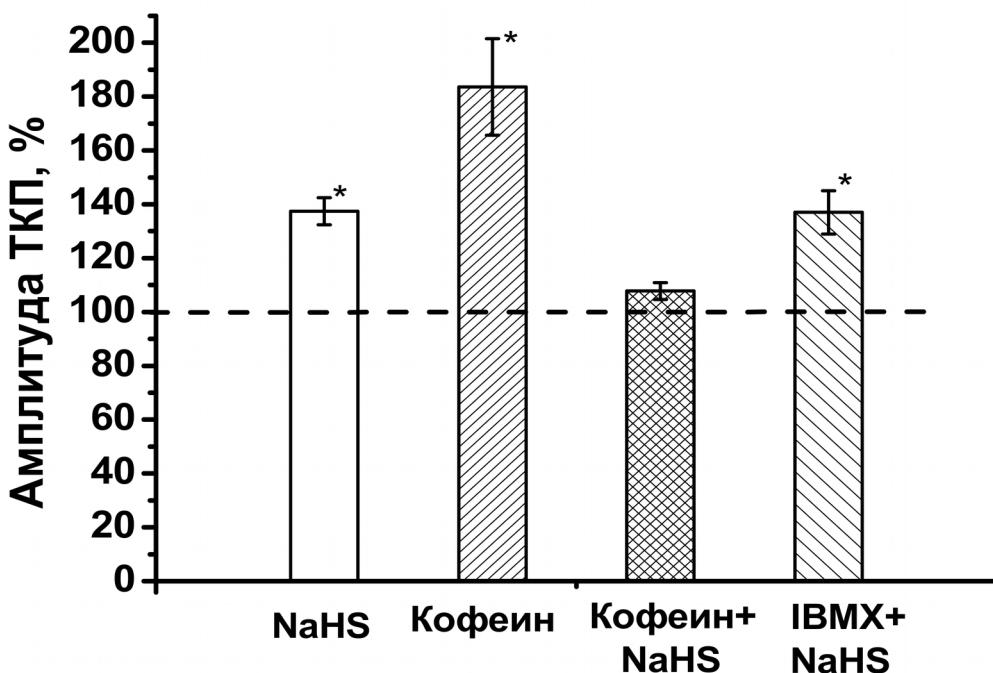


Рисунок 6 - Эффект сероводорода (300 $\mu\text{M}$ ) в контроле, на фоне агониста РиР - кофеина (1 $\text{mM}$ ) и на фоне блокатора фосфодиэстераз - IBMX (1  $\text{mM}$ )

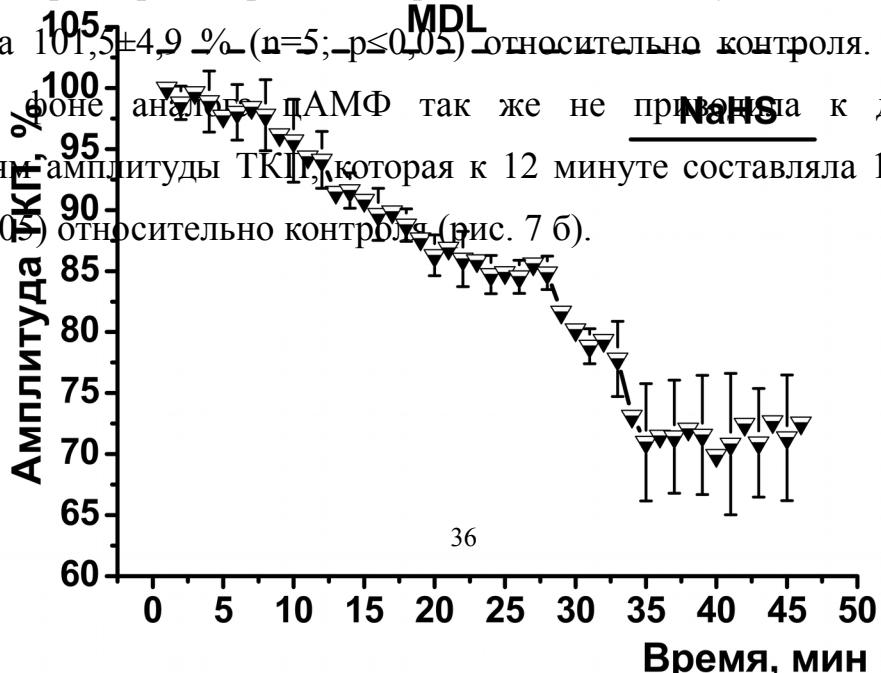
Известно, что кофеин, являясь активатором рианодиновых рецепторов, усиливает спонтанное и вызванное освобождение медиатора в различных типах терминалей (Lockerbie, Gordon-Weeks, 1986; Балезина и др., 2001). Кофеин, взаимодействуя с рианодиновыми рецепторами, способствует выбросу кальция из внутриклеточного депо. Этот процесс обуславливает кратковременное, но значительное увеличение ионизированного кальция, за которым следует снижение его концентрации ниже исходного уровня. В наших экспериментах аппликация кофеина вызывала усиление освобождение медиатора и предотвращала эффект NaHS, что указывает на возможную роль РиР в эффекте  $\text{H}_2\text{S}$ . Однако, следует отметить, что кофеин может блокировать фосфодиэстеразы и соответственно увеличивать уровень цАМФ в нервном окончании, что, как было показано ранее может

также опосредовать усиление освобождения медиатора при действии NaHS в результате фосфорилирования РиР протеинкиназой А (Ситдикова и др., 2009, Lanner, 2010) или других мишеней, таких как потенциал-зависимые Са-каналы или белки, участвующие в процессах экзоцитоза синаптических везикул (Петров 2008). Для того, чтобы исключить неспецифический эффект кофеина, использовали блокатор фосфодиэстераз – IBMX (100мкМ). В условиях блокирования фосфодиэстераз эффект H<sub>2</sub>S сохранялся. Таким образом, можно предположить, что активация рианодиновых рецепторов внутриклеточных Са<sup>2+</sup>-депо кофеином опосредует усиление секреции медиатора при действии сероводорода. В данном случае наблюдается эффект сероводорода только на рианодиновые рецепторы.

#### 2.2.4 Действие NaHS на фоне блокатора аденилатциклазы и аналога цАМФ

Для исследования роли цАМФ-системы в эффектах сероводорода использовали блокатор аденилатциклазы - MDL 12,330A hydrochloride (5 мкМ) и аналог цАМФ - 8-(4-chlorophenylthio)-adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. Блокатор аденилатциклазы вызывал значительное снижение амплитуды ТКП, которая к 35 минуте эксперимента составляла 70±4,8 % (n=5; p<0,05) по отношению к контролю (рис. 7 а). При этом на фоне MDL эффект донора сероводорода не проявлялся, амплитуда ТКП на 5 минуте составляла 101,5±4,9 % (n=5; p<0,05) относительно контроля. Аппликация NaHS на фоне аналога цАМФ так же не приводила к достоверным изменениям амплитуды ТКП, которая к 12 минуте составляла 103,5±12,5 % (n=7; p<0,05) относительно контроля (рис. 7 б).

а



6

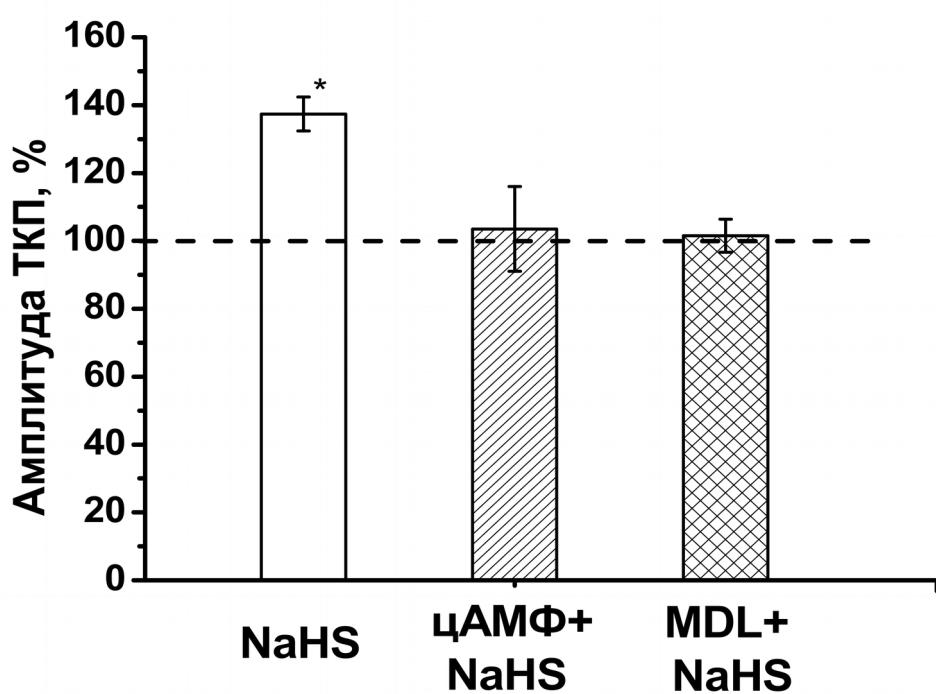


Рисунок 7 - а) - действие сероводорода (300 мкМ) на фоне аналога цАМФ (100 мкМ) и блокатора аденилатциклазы - MDL (5 мкМ); б) - действие сероводорода на фоне MDL

Из литературных данных известно, что физиологические концентрации  $H_2S$  увеличивают синтез цАМФ в первичных культурах нейронов мозга и посредством этого модулируют проводимость НМДА-рецепторов (Kimura, 2000). Было предположено, что в основе эффектов  $H_2S$  могут лежать

изменения внутриклеточных концентраций циклических нуклеотидов. Повышение внутриклеточной концентрации цАМФ приводит усилию секреции медиатора за счет активации протеинкиназы А и регуляции внутриклеточного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  (Takasago et al., 1989; Terrian et al., 1995). Исследования роли циклических нуклеотидов в эффектах  $\text{H}_2\text{S}$  в нервно-мышечном синапсе холоднокровных показало, что цАМФ-зависимые механизмы вовлечены в реализацию эффекта газа, при этом  $\text{H}_2\text{S}$  не оказывает прямого влияния на активность аденилатциклазы (Sitdikova et al., 2009). Таким образом, вопрос о молекулярных мишениях сероводорода в нервно-мышечном синапсе остается открытым. В наших экспериментах на фоне действия аналога цАМФ отсутствовало облегчающее влияние  $\text{H}_2\text{S}$  на вызванную секрецию медиатора по сравнению с контролем. При этом на фоне ингибирования аденилатциклазы сероводород так же не вызывал увеличение вызванного освобождение медиатора. Следовательно, изменение уровня цАМФ вовлечено в реализацию эффекта  $\text{H}_2\text{S}$  на синаптическую передачу. Можно предположить, что повышение внутриклеточной концентрации цАМФ приводит к активации протеинкиназы А, которая регулирует внутриклеточный уровень  $\text{Ca}^{2+}$ , фосфорилируя субъединицы потенциалзависимых кальциевых каналов и рианодиновых рецепторов (Takasago et al., 1989; Hain et al., 1995; Terrian, 1995) и участвует в процессах экзоцитоза и эндоцитоза синаптических везикул (Петров и др., 2008).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствует о том, что сероводород может синтезироваться в области нервно-мышечного синапса в диафрагмальной мышце мыши и модулировать передачу сигнала в системе мотонейрон-скелетная мышца. Так же можно предположить, что активация РиР внутриклеточных кальциевых депо является одной из возможных мишеней действия  $\text{H}_2\text{S}$  в двигательном нервном окончании мыши. Возможными механизмами действия  $\text{H}_2\text{S}$  на РиР являются либо прямая модификации белковых субъединиц канала либо повышение уровня цАМФ и, как следствие, фосфорилирование РиР протеинкиназой А. В

результате усиления работы РиР происходит выброс ионов кальция из ЭПР и  
усиление спонтанного и вызванного освобождения медиатора.

## ВЫВОДЫ

1. В нервно-мышечном синапсе мыши донор  $H_2S$  –  $NaHS$  вызывал обратимое увеличение амплитуды токов концевой пластиинки (ТКП) и увеличивал частоту миниатюрных токов концевой пластиинки (МТКП), не изменяя их амплитудно-временных параметров, что свидетельствует о пресинаптическом эффекте  $H_2S$ .
2. L-цистеин, субстрат эндогенного синтеза  $H_2S$ , вызывал усиление освобождения медиатора, а блокаторы ферментов синтеза  $H_2S$  –  $\beta$ -циано-L-аланин (1 мМ) и аминооксиацетиловая кислота (1 мМ) оказывали противоположный эффект.
3. Мишенями действия сероводорода в двигательном нервном окончании являются рианодиновые рецепторы и аденилатциклазная система.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин, И.П. Нейрохимия. / И.П. Ашмарин, П.В. Стукалова // М.:Изд. Института биомедицинской химии РАМН. – 1996. – С. 470.
2. Балезина, О. П. Роль внутриклеточных кальциевых каналов нервных терминалей в различиях секреции медиатора / О. П. Балезина // Успехи физиол. наук. - 2002. - Т. 33, № 3. - С. 38-56.
3. Балезина, О.П. Вызванная активность нервно-мышечных синапсов мыши на фоне действия рианодина и дантролена / О.П Балезина, А.Н. Букия, В.И. Лаптева // Росс. Физиол. журнал им. Сеченова, 2001, Т. 87(11), С. 15111517.
4. Бухараева, Э.А. Влияние ингибитора протеинкиназы А на временной ход вызванной секреции квантов медиатора и токи концевой пластиинки в нервно-мышечном синапсе / Э.А. Бухараева, Д.В. Самигуллин, Р.Х. Гайнулов, Е.Е. Никольский // Доклады Академии наук.- 2001.- Т. 377, № 6.- С.1-3.
5. Гусев, Н.Б. Протеинкиназы: строение, классификация, свойства и биологическая роль // Соросовский образовательный журнал. - 2000. - Т.6 № 126. - С.4-12.
6. Казанский, В.В. Методика изготовления «самозаполняющихся» микроэлектродов / В.В. Казанский // Физиол. журнал СССР. - 1973. - Т. 59.
7. Костюк, П.Г. Микроэлектродная техника/ П.Г. Костюк. - Киев: Наукова думка, 1960. – 175 с.
8. Крутецкая, З.И. Механизмы внутриклеточной сигнализации / З.И. Крутецкая, О.Е Лебедев, Л.С. Курилова // Монография. – Спб.: Изд-во С.Петер. Ун-та. – 2003. – С. 208.
9. Лакин, Г.Ф. Биометрия/ Г.Ф. Лакин. - М.: Наука, 1984. – 351с.
- 10.Михайленко, Я.И. Курс общей и неорганической химии/ Я.И. Михайленко. - М.: Высшая школа, 1966. - 565 с.
- 11.Петров, А.М. Роль сигнального каскада цАМФ в кругообороте синаптических везикул двигательного нервного окончания / А.М.

- Петров, А.Р. Гиниатуллин, А.Л. Зефиров // Нейрохимия. – 2008. – Т.25, №3. – С. 1-9.
- 12.Реутов, В.П. Циклические превращения NO в организме млекопитающих / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, В.Е. Охотин, Н.С. Косицин. - М.: Наука 1998. – 156 с.
- 13.Рубцов, А.М. Кальциевые каналы (рианодиновые рецепторы) саркоплазматического ретикулума: структура и свойства/ А.М. Рубцов, М.А. Батрукова //Биохимия. - 1997. - Т. 62, № 9. - С. 1091-1105.
- 14.Ситдикова, Г.Ф. Роль циклических нуклеотидов в эффектах сероводорода на освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки / Г.Ф. Ситдикова, Е.В. Герасимова, Н.Н. Хаертдинов, А.Л. Зефиров // Нейрохимия.-2009.-Т.26, №4.-С.312-317.
- 15.Ситдикова, Г.Ф. Газообразные посредники в нервной системе / Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефиров // Рос. Физиол. Журнал. – 2006. – Т. 92, № 7. – С.872-882.
- 16.Теппермен, Дж. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. / Дж. Теппермен, Х. Теппермен // М.: Мир. - 1989. – С. 656.
- 17.Туракулов, Я.Х. Циклические нуклеотиды и регуляция клеточного метаболизма Я.Х. Туракулов, Т.С. Саатов, С.К. Халиков, Э.И. Исаев, М.Х. Гайнудинов //Изд-во "Фан". - 1983. - С. 240.
- 18.Яковлев, А. В. Внутриклеточные пресинаптические механизмы эффектов оксида азота (II) в нервно-мышечном соединении лягушки / А. В. Яковлев, Г. Ф. Ситдикова, А. Л. Зефиров // Нейрохимия - 2005. – Т. 22, №1. - С. 81-87.
- 19.Abe, K. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator / K. Abe, H. Kimura // J. Neurosci. - 1996. - V.16. - P.1066-1071.
- 20.Ali, M.Y. Hydrogen sulfide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a KATP channel-dependent pathway / M.Y. Ali, M. Whiteman, C.M. Low, P.K. Moore // J. Endocrinol – 2007. V. 195. – P. 105–112.

21. Beauchamp, R. O. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity / R. O. Beauchamp, J. S. Bus, J. A. Popp et al. // Crit. Rev. Toxicol. – 1984. – Vol. 13. – P. 25–97.
22. Belardinelli, M.C. Urinary sulfur compounds in Down syndrome / M.C. Belardinelli, A. Chabli, B. Chadefaux-Vekemans, P. Kamoun // Clin. Chem. – 2001. – Vol. 47. - P.1500-1501.
23. Berridge, M.J. Inositol triphosphate: a novel second messenger in cellular signal transduction / M.J. Berridge, R.F. Irvine // Nature. - 1984. - Vol. 312. - P. 315-321.
24. Bloomer, S. Blockade by cAMP of native sodium channels of adult rat skeletal muscle fibers // APJ. – 1998. - V. 275 № 6. - P. C1465-C1472.
25. Boehning, D. Novel neural modulators/ D. Boehning, S.H. Snyder // Snyder. Annu. Rev. Neurosci. – 2003. – Vol. 26. – P. 105-131.
26. Bondarenko, V.E. A model of graded calcium release and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel inactivation in cardiac muscle/ V.E. Bondarenko, G.C. Bett, R.L. Rasmusson // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2004. – Vol. 286, №3. – P. H1154-H1169.
27. Brenneman, K.A. Olfactory mucosal necrosis in male CD rats following acute inhalation exposure to hydrogen sulfide: reversibility and the possible role of regional metabolism / K.A. Brenneman, D.F. Meleason, M. Sar et al. // Toxicol. Pathol. – 2002. – Vol. 30. – P. 200-208.
28. Chaudhari, K. Role of sex and eNOS in cystathionine- $\gamma$ -lyase expression in mouse heart, brain and skeletal muscle / K. Chaudhari, N. H. Wisniewski, S. E. Bearden // FASEB Journal. - 2007. - V. 21. - P. 577 b
29. Chavis, P. Visualization of cyclic AMP-regulated presynaptic activity at cerebellar granule cells / P. Chavis, P. Mollard, J. Bockaert, O. Manzoni // Neuron. – 1998. - V.20. № 4. - P.773-81.
30. Chen, C. The mechanism of cAMP-mediated enhancement at a cerebellar synapse / C. Chen, W.G. Regehr // J. Neurosci. – 1997. – Vol. 17, № 22, - P. 8687-8694.

31. Cheung, US. Drosophila larva neuromuscular junction's responses to reduction of cAMP in the nervous system / US. Cheung, AJ. Shayan, HL. Atwood // J. Neurobiol. - 1999. - V. 40. № 1. - P. 1-13.
32. Coldberg, AL. Evidence for the role cyclic AMP in neuromuscular transmission / AL Coldberg, JJ. Singer // Proc. Natl. Acad. Sci. - 1969. - V. 64. - P. 131-141.
33. Coronado, R. Structure and function of ryanodine receptors / R. Coronado, J. Morrissette, M. Sukhareva, D.M. Vaughan // Am. J. Physiol. - 1994. - Vol. 266. - P. 1485-1504.
34. Dello, Russo, C. Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo- pituitary-adrenal axis function: in vitro and in vivo studies in the rat / C. Dello Russo, G. Tringali, E. Ragazzoni et al. // J. Neuroendocrinol. - 2000. - Vol. 12. - P. 225-233.
35. Distrutti, E. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels / E. Distrutti, L. Sediari, A. Mencarelli // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 2006. - Vol. 316. - P. 325-335.
36. Doeller, J.E. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues / J.E. Doeller, T.S. Isbell, G. Benavides // Anal. Biochem. - 2005. - Vol. 341. - P. 40-51.
37. Dominy, J. E. New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: production of H<sub>2</sub>S, a neuromodulator and smooth muscle relaxant / J. E. Dominy, M. H. Stipanuk // Nutr. Rev. - 2004. - V. 62. - P. 348-353.
38. Dorman, D.C. Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium / D.C. Dorman, F.J. Moulin, B.E. McManus // Toxicol. Sci. - 2002. - Vol. 65. - P. 18-25.
39. Dryden, WF., Singh YN., Gordon T., Lazarenko G. Pharmacological elevation of cAMP and transmitter release at the mouse neuromuscular junction // Can. J. Physiol. Pharmacol. - 1988. - V. 66. № 3. - P. 207-212.

40. Duman, J. G. What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? / J. G. Duman, J. G. Forte // Am. J. Physiol. Cell Physio. 2003. - V. 285. – P. C237–C249.
41. Ehrlich, B. The pharmacology of intracellular Ca<sup>2+</sup> -release channels/ B. Ehrlich, E. Kaftan, S. Besprozvannaja, I. Besprozvanniy // TIPS. - 1994. - Vol. 15. - P. 145-149.
42. Eto, K. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation / K. Eto, M. Ogasawara, K. Umemura // J. Neurosci. - 2002. - V. 22. - P. 3386-3391.
43. Flink, M.T. Ca<sup>2+</sup> channels as targets of neurological disease: Lambert-Eaton Syndrome and other Ca<sup>2+</sup> channelopathies/ M.T. Flink, W.D. Atchison // J. Bioenerg. Biomembr. – 2003. – Vol. 35, № 6. – P. 697-718.
44. Francis, SH. Structure of cyclic nucleotide – dependent protein kinases / SH. Francis, JD. Corbin // Annu Rev. Physiology. 1994. - V. 56. - P.237-272.
45. Garcia-Bereguain, M. A. Hydrogen sulfide raises cytosolic calcium in neurons through activation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels / M. A. Garcia-Bereguain, A.K. Samhan-Arias, F.J. Martin-Romero, C. Gutierrez-Merino // Antiox Redox Signal - 2008. - V. 10. - P. 31-41.
46. Garthwaite, J. Nitric oxide signaling in the central nervous system / J. Garthwaite, C.L. Boulton // Annu. Rev. Physiol. - 1995. – Vol. 57. – P. 683-706.
47. Gerasimova, E.V. Hydrogen Sulfide as an Endogenous Modulator of Mediator Release in the Frog Neuromuscular Synapse / E.V. Gerasimova, G.F. Sitdikova, A.L. Zefirov // Neurochemical J. – 2008/ - Vol. 2, № 1-2. -P. 120-126.
48. Goldberg, A.L. Evidence for the role of cyclic AMP in neuromuscular transmission / A.L. Goldberg, J.J. Singer // PNAS USA. – 1969. - Vol. 64. - P. 131-141.
49. Goodwin, L. R. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports / L.R. Goodwin,

- D. Francom, F.P. Dieken et al. // J. Analyt. Toxicol. – 1989. – Vol. 13. - P. 105–109.
50. Hain, R.D. Respiratory symptoms in children dying from malignant disease/ R.D. Hain, N. Patel, S. Crabtree, R. Pinkerton.// Palliat. Med. – 1995. – Vol. 9, №3. – P.201-206.
51. Hanoune, J. Adenylyl cyclase: structure, regulation and function in an enzyme superfamily / J. Hanoune, Y. Pouille, E. Tzavara, T. Shen, L. Lipskaya // Molecular and Cellur Endocrinology. – 1997. – V. 128. - P.179-194.
52. Henzi, V. Characteristics and function of  $\text{Ca}^{2+}$  and inositol 1,4,5-triphosphate-releasable stores of  $\text{Ca}^{2+}$  in neurons / V.Henzi, A.B. MacDermott // Neurosci. - 1992. - Vol. 46. - P. 251-274.
53. Hidalgo, C. Redox regulation of RyR-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release in muscle and neurons/ C. Hidalgo, R. Bull, M.I. Behrens, P. Donoso// Biol. Res. – 2004. – Vol. 37, № 45. – P.39-52.
54. Hosoki, R. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide / R. Hosoki, N. Matsuki, H. Kimura // Bioch. Bio. Res Com. - 1997. - V. 237. - P. 527-531.
55. Huang, C.C. Enhancement of NMDA receptor-mediated synaptic potential by isoproterenol is blocked by Rp-adenosine 3',5'-cyclic monophosphothioate / C.C Huang., J.J. Tsai, P.W.Gean // Neurosci. Lett. – 1993. – Vol. 161. – P. 207–210.
56. Kamoun, P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals / P. Kamoun // Amino Acids. – 2004. – Vol. 26. – P. 243-254.
57. Kaneko, S. Differential regulation of N- and Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel by cyclic nucleotides and G-protein / S. Kaneko, A. Akaike, M. Satoh // Life Sci. - 1998. - V. 62. № 17. - P. 1543-1547.
58. Kaneko, Y. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel

- gasotransmitter / Y. Kaneko, Y. Kimura, H. Kimura, I. Niki // Diabetes. – 2006. – V. 55, № 5. – P.1391-1397.
59. Katz, B. A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses/ B. Katz, R. Miledi // J. Physiol. (Lond.). - 1967. - Vol. 192. - P. 407-436.
60. Kawabata, A. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger / A. Kawabata, T. Ishiki, K. Nagasawa et al. // Pain. – 2007. – Vol. 132. – P. 74– 81.
61. Keller, JN. Cyclic nucleotides attenuate lipid peroxidation-mediated neuron toxin / JN. Keller, KB. Hanni, MP. Mattson, WR. Markesberry // Neuroreport. - 1998. - V. 9. № 16. - P. 1-4.
62. Khan, A.A. Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats / A.A. Khan, M.M. Schuler, M.G. Prior et al. // Toxicol. Appl. Pharm. – 1990. – Vol. 103, № 3. – P. 482-490.
63. Kimura M. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor//Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. - V.267. - P. 129-133.
64. Kimura, Y. Hydrogen sulfide protects HT neuronal cells from oxidative stress/ Y. Kimura, R. Dargusch, D. Schubert, H. Kimura // Antioxid. Redox. Signal. – 2006. – V. 8. – P. 661-670.
65. Kobayashi, H. Role of cyclic nucleotides in the synaptic transmission in sympathetic ganglia of rabbits // Comp. Biochem. Physiol. -1982. - V. 72. № 2. - P. 197-202.
66. Kombian, SB. The actions of hydrogen sulfide on dorsal raphe serotonergic neurons in vitro / SB. Kombian, RJ. Reiffenstein, WF. Colmers // J Neurophysiol. – 1993. - Vol.70(1). – P. 81-96.
67. Kuba, K.  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in neurones / K.Kuba // Jap. J. Physiol. - 1994. - Vol. 44. - P. 613-650.
68. Lanner, JT. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release / JT. Lanner, DK. Georgiou, AD. Joshi, SL. Hamilton // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2010. - Nov; 2(11):a003996.

69. Li, L. Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? / L. Li, P.K. Moore// Trends Pharmacol Sci.– 2008. – Vol. 29, № 2. – P. 84-88.
70. Liang, Y. Calcium signaling at single mossy fiber presynaptic terminals in the rat hippocampus/ Y. Liang, L.L. Yuan, D. Johnston, R. Gray //J. Neurophysiol. – 2002. – Vol. 87, № 2. – P. 1132-1137.
71. Lindgren, S.A. Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction / S.A. Lindgren, M.W. Laird // NeuroReport. - 1994. - Vol. 5, № 16. - P. 2205-2208.
72. Lockerbie , PR. Further characterization of [3H]gamma-aminobutyric acid release from isolated neuronal growth cones: role of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores / RO. Lockerbie, PR. Gordon-Weeks // Neuroscience. – 1986. - Vol. 17(4). – P. 1257-66
73. LoPachin, R.M. Synaptic cysteine sulfhydryl groups as targets of electrophilic neurotoxicants / R.M. LoPachin, , D.S. Barber // Toxicological sciences. 2006. - V. 94.№ 2. - P. 240–255.
74. Lowicka, E. Hydrogen sulfide – the third gas of interest for pharmacologists/ E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacol. Rep. - 2007. - Vol. 59. - P. 4-24.
75. Lu, S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies// FASEB J. – 1999. – V. 13 - P.1169-1183.
76. Lu, Y. Cloning and nucleotide sequence of human liver cDNA encoding for cystathionine-γ-lyase / Y. Lu, B.F. O'Dowd, H. Orrego, Y. Israel // Bioch. Bio. Res. Com. - 1992. - V. 189. - P. 749-758.
77. McGraw , CF. Localization of calcium in presynaptic nerve terminals. An ultrastructural and electron microprobe analysis / CF. McGraw, AV. Somlyo, MP. Blaustein // J Cell Biol. – 1980. - Vol. 85(2). – P. 228-41
78. Meier, M. Structure of human cystathionine beta-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein / M. Meier, M. Janosik, V. Kery // EMBO J. - 2001. V.20. -P. 3910-3916.

79. Meissner, G. Ryanodine receptor/Ca <sup>2+</sup> release channels and their regulation by endogenous effectors / G. Meissner // Ann. Rev. Physiol. - 1994. - Vol. 56. - P. 485-508.
80. Miller, R.J. Voltage-sensitive Ca channels // J. Biol. Chem. - 1990. - V. 267. - P. 1403-1406.
81. Mittal, CK. Synthesis of cAMP by guanylate cyclase: a new pathway for its formation / CK. Mittal, JM. Braughler, K. Ichihara, F. Mirad // Biochim. Biophys Acta. - 1979. - V. 585. - P. 333-342.
82. Mok, Y.Y. Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis/ Y.Y. Mok, M.S. Atan, C. Yoke Ping et al. // Br. J. Pharmacol. – 2004. – Vol. 143. – P. 881-889.
83. Moore, P.K. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? / P.K. Moore, M. Bhatia, S. Moothala// Trends. Pharmacol. Sci. – 2003. – Vol. 24 – P. 609-611.
84. Mustafa, A.K. Signaling by Gasotransmitters / A.K. Mustafa, M.M. Gadalla, S.H. Snyder // Sci. Signal.-2009.-V. 2, № 68.- P. 1-8.
85. Nagai, Y. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes / Y. Nagai, M. Tsugane, J. Oka, H. Kimura // FASEB J. - 2004. - V. 18. - P. 557-559.
86. Narita, K. Functional coupling of Ca<sup>2+</sup> channels to ryanodine receptors at presynaptic terminals. Amplification of exocytosis and plasticity/ K. Narita, T. Akita, J. Hachisuka et al. // J. Gen. Physiol. – 2000. – Vol. 115. – P. 519–532.
87. Patacchini, R. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder / R. Patacchini, P. Santicioli, S. Giuliani, C.A. Maggi // Br. J. Pharmacol. - 2004. - V.142. - P. 31-34.
88. Porter, VA. Frequency modulation of Ca<sup>2+</sup> sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides / VA. Porter, AD. Bonev // Am. J. Physiology. – 1998. - V. 274. № 5. - P. C1346-C1355.

89. Pozzan, T. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores / T. Pozzan, P. Voipe, R. Rizzuto, J. Meldolesi // *Physiol. Rev.* - 1994. - Vol. 74. - P. 595-636.
90. Qu, K. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage/ K. Qu C.P. Chen, B. Halliwell et al. // *Stroke.* - 2006. - Vol. 37. - P. 889-893.
91. Qu, K. Hydrogen sulfide: Neurochemistry and neurobiology / K. Qu, S.W. Lee, J.S. Bian // *Neurochem. Int.* 2008. - V. 52. - P. 155-165.
92. Reiffenstein, R. J. Toxicology of hydrogen sulfide/ R. J. Reiffenstein, W. C. Hulbert, S. H. Roth // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 1992. - Vol.32. - P.109-134.
93. Roth, S.H. Hydrogen Sulfide /In: *Handbook of Hazardous Materials*// S.H. Roth. - USA.: Academic Press Inc., 1993. - P. 367-376.
94. Ruehr, ML. Targeting of protein kinase A by muscle A kinase-anchoring protein (mAKAP) regulates phosphorylation and function of the skeletal muscle ryanodine receptor / ML. Ruehr, MA. Russell, DG. Ferguson, M. Bhat, J. Ma, DS. Damron, JD. Scott, M. Bond // *J Biol Chem.* - 2003. - Vol. 278(27). - P. 24831-6.
95. Russo, C.D. Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: in vitro and in vivo studies in the rat / C.D. Russo, G. Tringali, E. Ragazzoni // *J. Neuroendocrinol.* - 2000. - V. 12. - P. 225-233.
96. Sah, P.  $Ca(2+)$ -activated  $K^+$  currents underlying the afterhyperpolarization in guinea pig vagal neurons: a role for  $Ca(2+)$ -activated  $Ca^{2+}$  release / P. Sah, EM. McLachlan // *Neuron.* - 1991. - Vol. 7(2). - P. 257-64.
97. Schenk, PW. Signal perception and transduction: the role of protein kinases / PW. Schenk., BE. Snaar-Jagalska // *Biochimica et Biophysica Acta.* - 1999. - V. 1449. - P.1-24.
98. Shugar, D. Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs 93. / D. Shugar // *Pharmacology and Thearapeutics.* - 2000. - V. 87. - P.199-226.

99. Situdkova, G.F. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium 5 (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells / G.F. Situdkova, T.M. Weiger, A. Hermann // Pflugers. Arch. – Eur. J. Physiol. – 2010. V. 459. – P.389–397.
100. Situdkova, G.F. Modulation of Neurotransmitter Release by Carbon Monoxide at the Frog Neuro-Muscular Junction / G. F. Situdkova // Curr Drug Metab. - 2007. - Vol. 8, №. 2. - P. 177-184.
101. Sitsapesan, R. Cyclic ADP-ribose, the ryanodine receptor and Ca<sup>2+</sup> release / R. Sitsapesan, SJ. McGarry, AJ. Williams // Trends Pharmacol Sci. – 1995. - Nov; Vol. 16(11). – P. 386-91.
102. Sivarajah, A. The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat / A. Sivarajah, M.C. McDonald, C. Thiemermann // Shock. – 2006. - V. 6, № 2. –P.154-161.
103. Standaert, FG. Cyclic nucleotides and neuromuscular transmission / FG Standaert, KL Dretchen // Fed Proc. - 1979 - V.38. № 8. - P.2183-2192.
104. Stipanuk, M.H. Catabolism of cysteine by rat renal cortical tubules/ M.H. Stipanuk, J. De la Rosa, L.L. Hirschberger // J. Nutr. – 1990. – Vol. 120. – P. 450-458.
105. Stipanuk, M.H. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat / M.H. Stipanuk, P.W. Beck // Biochem J. – 1982.-V. 206, № 2. -P. 267-277.
106. Stipanuk, M.H. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine / M.H. Stipanuk // Annu Rev. Nutr. – 2004. – Vol. 24. – P. 539-577.
107. Sun, Y. Heme oxygenase-2 mRNA: developmental expression in the rat liver and response to cobalt chloride / Y. Sun, M.D. Maines // Arch. Biochem. Biophys. - 1990.- Vol. 282, - P.240–245.

108. Sutherland, E.W. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles / E.W. Sutherland, I.W. Rall // Biol. Chem. - 1958. - V. 232. - P. 1077-1059.
109. Swaroop, M. Rat cystathionine beta-synthase. Gene organization and alternative splicing / M. Swaroop, K. Bradley, T. Ohura // J Biol Chem. – 1992. – V. 267, № 16: - P.11455-11461.
110. Takasago, T. Phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor by cAMP-dependent protein kinase/ T. Takasago, T. Imagawa, M. Shigekawa//J. Biochem. – 1989 – Vol. 106, №5. – P. 872-877.
111. Tang, G. The effect of hydroxylamine on KATP channels in vascular smooth muscle and underlying mechanisms/ G. Tang , L. Wu , R. Wang // Mol. Pharmacol. – 2005. – Vol. 67, № 5. – P. 1723-1731.
112. Telezhkin, V. Hydrogen sulfide inhibits human BK(Ca) channels / V. Telezhkin, S.P. Brazier, S. Cayzac // Adv. Exp. Med. Biol. – 2009. – V. 648. – P. 65-72.
113. Terrian, D.M. Persistent enhancement of sustained calcium-dependent glutamate release by phorbol esters:requirement for localized calcium entry / D.M. Terrian, D.K. Ways // J. Neurochem. - 1995. - V.64. - P. 172-180.
114. Tomas, S. Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse / S. Thomas, R. J. Robitaille // Neuroscience – 2001. - Vol. 21, № 4, - P.1087-1095.
115. Truong, D.H. Molecular Mechanisms of Hydrogen Sulfide Toxicity/ D.H. Truong, M A. Eghbal, W Hindmarsh et al. // Drug. Metabolism Reviews. – 2006. - Vol. 38, № 4. – P. 733 – 744.
116. Ubuka, T. Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues / T. Ubuka // J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. – 2002. – Vol. 781. – P. 227–249.

117. Urbano, F.J. Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals / F.J. Urbano, R.S. Depetris, O.D. Uchitel // Pflugers. Arch. – 2001. – Vol. 441, № 6. – P. 824-831.
118. Van der Kloot, W. Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction / W. Van der Kloot, J. Molgo // Physiol. Rev. - 1994. - V. 74, № 4. - P. 899-991.
119. Van der Molen, E.F. Homocysteine metabolism in endothelial cells of a patient homozygous for cystathionine beta-synthase (CS) deficiency / E.F. Van der Molen, M.J. Hiipakka, van Lith-Zanders // Thromb. Haemost. – 1997. - V. 78. – P.827-833.
120. Wang, J. Genomic basis of cystathioninuria (MIM219500) revealed by multiple mutations in cystathionine- $\gamma$ -lyase (CTH) / J. Wang, RA. Hegele // Hum. Genet. – 2003. – Vol. 112. – P.404-408.
121. Wang, R. Signal Transduction and the Gasotransmitters. NO, CO and H2S in Biology and Medicine/ R.Wang. – Totowa: Humana Press, 2004. - 377 p.
122. Wang, R. Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? / Wang, R. // FASEB J. - 2002. - V.16. -P.1792-1298.
123. Warenycia, M.W. Monoamine oxidase inhibition as a sequel of hydrogen sulfide intoxication: increases in brain catecholamine and 5-hydroxytryptamine levels. / M.W. Warenycia, // Arch. Toxicol. - 1989. - V. 63, 131-136.
124. Whiteman, M. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? / M. Whiteman, N.S. Cheung, Y.Z. Zhu // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – Vol. 326. – P. 794-798.
125. Whiteman, M. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? / M. Whiteman, J.S. Armstrong, S.H. Chu et al.// J. Neurochem. – 2004. – Vol. 90. – P. 765-768.

126. Wildemann, B. Nitric oxide and cGMP induced vesicle release at Drosophila neuromuscular junction / B. Wildemann, G. Bicker // J. Neurobiol. - 1999. - Vol. 39, № 3. - P. 337-346.
127. Yap, S. Vascular complications of severe hyperhomocys-teinemia in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: effects of homocysteine-lowering therapy / S. Yap, E. Naughten, B. Wilcken // Semin. Thromb. Hemost. - 2000. - V. 26. - P. 335-340.
128. Yewei, L.I.  $\text{Ca}^{2+}$  handling by phosphorylation status in mouse fast- and slow-twitch skeletal muscle fibers / L.I. Yewei, F. Martin // AJP. - 1997. - V. 227. - P. 840-880.
129. Yoshihara, M. Two independent pathways mediated by cAMP and protein kinase a enhance spontaneous transmitter release at Drosophila neuromuscular junctions / M. Yoshihara, K. Suzuki, Y. Kidokoro // The Journal of Neuroscience. - 2000. - V. 20, № 22. - P.8315–8322.
130. Zhao, W. HS-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms / W. Zhao, R. Wang // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. - 2002. - Vol.283. - P. H474-H480.
131. Zhao, W. The vasorelaxant effect of  $\text{H}_2\text{S}$  as a novel endogenous gaseous  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel opener / W.Zhao, J.Zhang, Y. Lu, R.,Wang // EMBO J.- 2001. - Vol. 20. - P. 6008-6016.
132. Zucchi, R. The sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states / R. Zucchi, S. Ronca-Testoni // Pharmacol Rev. – 1997. - Vol. 49(1). – P. 1-51.