



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по Невробиология



Роля на въглеродния оксид в регулиране
на съкратителната активност
на висцерални мускули

ДИСЕРТАЦИЯ

на Борис Георгиев Кадинов

за присъждане на образователна и научна степен
“Доктор”

Професионално направление 4.3 “Биологически науки”
научна специалност “Физиология на животните и човека”

Научен консултант: Чл.кор. д-р Радомир Радомиров

София
2014г.

СЪДЪРЖАНИЕ

- I. УВОД
- II. Литературен обзор
 - II.1. Въглероден оксид - характеристика, външни и ендогенни източници и токсичност
 - II.2. Влияние на оксидативния стрес върху гладката мускулатура
 - II.2.1. Състояния на оксидативен стрес
 - II.2.1.1. Формиране на реактивни кислородни радикали (ROS) и индуциране на оксидативен стрес
 - II.2.1.2. Neme oxygenase – индикатор за състояния на оксидативен стрес
 - II.2.2. Влияние на оксидативния стрес върху съдовата гладка мускулатура
 - II.3. Общи сведения за организацията на стомашно-чревната и съдовата мускулатура
 - II.3.1. Структура на стомашно-чревната мускулатура
 - II.3.2. Структура на съдовата мускулатура
 - II.3.3. Характеристика на съкратителната активност на гладката мускулатура
 - II.4. Регулация на съкратителната активност на стомашно-чревната и съдовата гладка мускулатура
 - II.4.1. Роля на НАНХ невротрансмисия
 - II.4.2. Роля на Въглеродният оксид в съкратителната активност
 - II.4.3. Въглеродният оксид – модулатор на съкратителната активност на гладките мускули
 - II.5. Заключение
- III. Цел и задачи
- IV. Материали и методи
 - IV.1. Обекти на изследване
 - IV.2. Методи на изследване
 - IV.2.1. Метод на индуциране на оксидативен стрес с тежки метали
 - IV.2.2. Метод на индуциране на оксидативен стрес с водороден пероксид (H_2O_2)
 - IV.2.3. Имунохистохимичен метод за доказване на Neme oxygenase
 - IV.2.4. Хистохимичен метод за доказване на NADPH

- IV.2.5. Метод за регистриране на съкратителна активност на гладкомускулни препарати
- IV.2.6. Метод за изолиране на *a. coronaris*
- IV.2.7. Метод за изолиране на *a. basilaris*
- IV.2.8. Метод за изолиране на *a. ophthalmica*
- IV.2.9. Метод за регистриране на съкратителна активност на съдови сегменти
- IV.3. Статистическа обработка на експерименталните резултати
- IV.4. Разтвори и субстанции
 - IV.4.1. За изследване на на съкратителна активност на гладкомускулни препарати от стомашно-чревен тракт
 - IV.4.2. За изследване съкратителната активност на съдови сегменти
- V. Резултати и обсъждане
 - V.1. Участие на ендогенния въглероден оксид в реализиране на съкратителния отговор при гладко-мускулни препарати от фундус на стомах
 - V.1.1. Имунохистохимично доказване наличието на НО във фундус на стомах
 - V.1.2. Хистохимично доказване наличието на NADPH във фундус на стомах
 - V.1.3. Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на циркуларни гладкомускулни препарати от фундус на морско свинче
 - V.2. Участие на ендогенния въглероден оксид в реализиране на съкратителния отговор при съдови гладко-мускулни препарати
 - V.2.1. Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на съдови препарати от коронарна артерия на морско свинче
 - V.2.2. Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на съдови препарати от *a. basilaris* на морско свинче
 - V.2.3. Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на съдови препарати от *a. ophthalmica* на плъх
 - V.3. Промени в съкратителната активност на сегменти от кръвоносни съдове под влияние на свободни кислородни форми
- VI. Заключение
- VII. Изводи
- VIII. Приноси
- IX. Литература

Често използвани съкращения:

CO – въглероден оксид

NO – азотен оксид

HO/HO1/HO2 – heme oxygenase, хем оксигеназа-1 /-2

CO-Hb – карбокси-хемоглобин

NOS – азотно-окисна синтаза

NADPHd – NAD-диафораза

SnPPIX – калаен протопорфирин - IX

sGC – разтворима гуанилат циклаза

NANC/НАНХ – неадренергичен нехолинергичен

VIP – вазоактивен интестинален полипептид

АТФ – аденозин трифосфат

SP – субстанция Р

IP₃ – инозитол трифосфат

SOD/СОД – супероксид дисмутаза

ROS – реактивни кислородни форми

GSH – глутатион

GPX – глутатион пероксидази

ПОЛ – пероксидно окисление на липидите

LOOH/ЛХП – липидни хидропрекиси

VSMC – съдови гладкомускулни клетки

ПНМК – полиненаситени мастни киселини

PKA/PKB/PKC – Протеин киназа А/ В/ С

ЕПС – електрическа полева стимулация

CORMs - CO-освобождаващи молекули

Hb - хемоглобин

Mb - миоглобин

BV - биливердин

I. УВОД

Дълги години въглеродният оксид (CO), който се съдържа в отработените автомобилни и промишлени газове и цигарения дим беше разглеждан единствено като отровен газ, който се отделя при непълното изгаряне на въглеводороди. За живите организми той е токсичен, влияе на централната нервна и сърдечно-съдовата системи. Той подтиска както вътреклетъчните оксиредуктази, така и транспорта на кислорода от кръвта към тъканите като се свързва с хемоглобина, конкурирайки кислорода.

През последните години, ендогенно образувания CO е доказано, че притежава интересни свойства на сигнална молекула, влияеща върху множество критични клетъчни функции, включително, но не ограничаващи се до възпаление, клетъчна пролиферация и клетъчна смърт. Ерата на газови молекули в биомедицинските изследвания и болести при човека започва с откритието, че отделеният от ендотела клетъчен релаксиращ фактор (EDRF) е идентичен с молекулата на газообразния азотен оксид (NO). Откритието, че ендогенно произведени газови молекули като NO, а сега и CO и H₂S, могат да участват в осъществяването на мощни физиологични и биологични функции, наистина представлява промяна в парадигмата и разкрива нови пътища на интензивно изследване.

II. Литературен обзор

II.1. Въглероден оксид - характеристика, външни и ендогенни източници и токсичност.

CO е двуатомна молекула с ниско молекулно тегло (28.01 g.mol^{-1}), намиращ се естествено в газообразно състояние при атмосферна температура и налягане ($T_T -205 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_K -191.5 \text{ }^\circ\text{C}$; плътност $1,250 \text{ g.L}^{-1}$ при $0 \text{ }^\circ\text{C}$) (Von Berg, 1999). CO е разтворим във водна среда ($2.6 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ при 20°C) и органични разтворители (Raub, 1999; Von Berg, 1999). CO е относително по-стабилен в биологичните системи, в сравнение с NO, който също е с малка молекула, газообразен и с подобна структура и размер. За разлика от CO, който няма несдвоени електрони, NO е свободен радикал с един несдвоен електрон. NO реагира с други свободни радикали като O_2^- и приема променливи състояния на окисление от приемането или отдаването на електрони (NO^+ , NO^-) (Goldstein, 1995; Huie a. Padmaja, 1993). И двата газа, CO и NO, функционират като лиганди на желязо в хема и образуват комплекси с няколко хем-протеини и метало-ензими (Coburn et al. 1987; Maines, 1997). Като повсеместен замърсител на въздуха, CO се образува преди всичко при непълното изгаряне на органични съединения. Основно, образуването на CO в околната среда е следствие от окислението на въглеродороди в естествените водни басейни, метаболизмът на растенията и океанска дейност, катастрофални събития като вулканични емисии и горски пожари (Raub, 1999). CO също се образува и от човешки дейности, свързани с изгарянето на изкопаеми горива, в битови или промишлени процеси, както и като основен компонент в емисии на автомобилните двигатели (Von Berg, 1999; Raub, 1999). В резултат на различните експозиции заболяемостта и смъртността, най-често възникват в резултат на неправилно използване на пещи, бойлери, двигатели или открит пламък в недостатъчно проветриви места. Поради невидимостта си, както и липсата на мирис, CO е особено опасен при вдишване (Von Berg, 1999).

Клиничните прояви на отравяне с CO включват виене на свят, сънливост, повръщане, главоболие и загуба на двигателна координация (Gorman et al., 2003; Weaver, 1999). Удължено излагане на въздействие с CO може да предизвика дихателни затруднения, дезориентация, болки в гърдите, загуба на съзнание или кома и в крайна сметка може да доведе до смърт. Хроничното излагане на сублетални концентрации може да предизвика загуба на паметта и други познавателни и неврологични усложнения (Weaver, 1999). Симптомите на хипоксично отравяне с CO започват да се появяват при 20% CO-Нб. Смъртта вероятно настъпва в границите от 50 - 80% CO-Нб

(Smith, 1986; Von Berg, 1999). Изследвания при инхалационно приложение върху плъхове показват, че CO може да предизвика окислително увреждане на мозъка, доказано с повишена липидна пероксидация и апоптична клетъчна смърт (Piantadosi et al., 1997; Thom, 1990; Thom, 1993).

Освен чрез въздействието на фактори от околната среда, значително количество на CO се образува ендогенно като продукт на обмяната на веществата. В средата на XX век Sjostrand (1949; 1952) прогнозира възникването на ендогенен CO от окислението на methene-моста на въглерода в хема. Като използват хем-белязани с ^{14}C хемоглобини, Кобърн и сътр. (1967) показват метаболитното разграждане на хемоглобина до CO при кучета. Размерът на ендогенната продукция на CO при хора за първи път е оценена на 0,42 ml/h чрез анализи на карбоксихемоглобин в кръвта (Coburn et al., 1963). Свързването на ендогенното производство на CO с ясно изразен ензимен механизъм и описанието на този ензим, Неме oxugenase (НО), за първи път е направено от Tenhunen и сътр. (1969). Като метаболит на катализираното от НО разграждане на хема, CO е официално считан за катаболитно отпадъчен продукт. В отсъствие на значителен атмосферен CO, по-голямата част от кръвния CO-Нб се образува от ендогенната продукция, съответстваща на нивата на кръвния CO - 0.4 - 1% (Von Berg, 1999). Тези стойности нарастват с увеличаване нивото на CO в околната среда. Например за пушачите са посочени средни стойности от около 8.3% CO-Нб (Raub, 1999). Най-малко 86% от ендогенното производство на CO е с произход от обмяната на хема, а останалите количества може да се получат от други метаболитни процеси включително липидното окисление (Archakov et al., 2002; Vreman et al., 1998; Vreman et al., 2000) и ксенобиотичен метаболизъм (Vreman et al., 2000). Въпреки че ендогенната продукция на CO от източници различни от хема не е добре определена в нормални условия, вероятно е тя да има голямо значение при патологични състояния или токсикологични ситуации като излагане на халогенирани въглеводороди (Guengerich, 1991; Oh et al., 2002; Stewart et al., 1972). В отговор на повишения CO на околната среда, кръвните нива на CO-Нб се повишават при патологични или токсикологични условия, които водят до цялостно или тъканно-специфично повишаване на НО-1. Повишаването на системната експресия на НО-1 може да се прояви като възпаление, физически стрес, или повишена предразположеност към въздействието на различни агенти (Ryter a. Otterbein, 2004).

II.2. Влияние на оксидативния стрес върху гладката мускулатура

II.2.1. Състояния на оксидативен стрес

Оксидативният стрес се дефинира като дисбаланс между продукцията на свободни радикали и активността на антиоксиданти (Hybertsona et al., 2011; Birben et al., 2012). Оксидативният стрес в клетките може да се прояви в резултат на един от следните три фактора.

- увеличаване на оксидантната продукция;
- намаляване на антиоксидантната протекция или
- невъзможност за възстановяване на оксидативните увреждания.

Клетъчните увреждания се предизвикват от реактивни кислородни радикали (ROS), които могат да бъдат или свободни радикали, реактивни аниони, съдържащи кислородни атоми или молекули, съдържащи кислородни атоми, които могат да продуцират свободни радикали или да са химически активирани от тях. Примери за това са хидроксилният радикал, супероксидният радикал, хидроген пероксид и пероксинитрит. При нормални условия, ROS се премахват от клетките посредством действието на супероксидната дисмутаза (SOD), каталаза или глутатион пероксидаза (GPX). Главното увреждане на клетките е резултат от ROS-предизвиканото изменение на макромолекулите като например полиненаситените мастни киселини в мембранните липиди, есенциалните протеини и ДНК (**Схема 1**).

Оксидативният стрес се свързва с клетъчна смърт, която се асоциира с определени невродегенеративни състояния. В последните години той се разглежда като един от най-значимите фактори в патогенезата в исхемията на мозъка и на редица невродегенеративни заболявания като Алцхаймер, болестта на Паркинсон, епилепсия, множествена склероза, стареене и др.

Въпреки множеството изследвания върху оксидативния стрес, влиянието му върху невроналното увреждане в ентеричната нервна система все още не е достатъчно изяснено.

II.2.1.1. Формиране на реактивни кислородни радикали (ROS) и индуциране на оксидативен стрес

При естествени условия в клетката се продуцират свободни радикали. Процесите са много сложни и обхващат голям брой реакции. Известни са няколко типа процеси, при които се образуват радикали в живите системи:

- Унивалентна редукция на кислорода
- Радиолиза
- Електронен пренос от метални йони с променлива валентност към органични молекули.

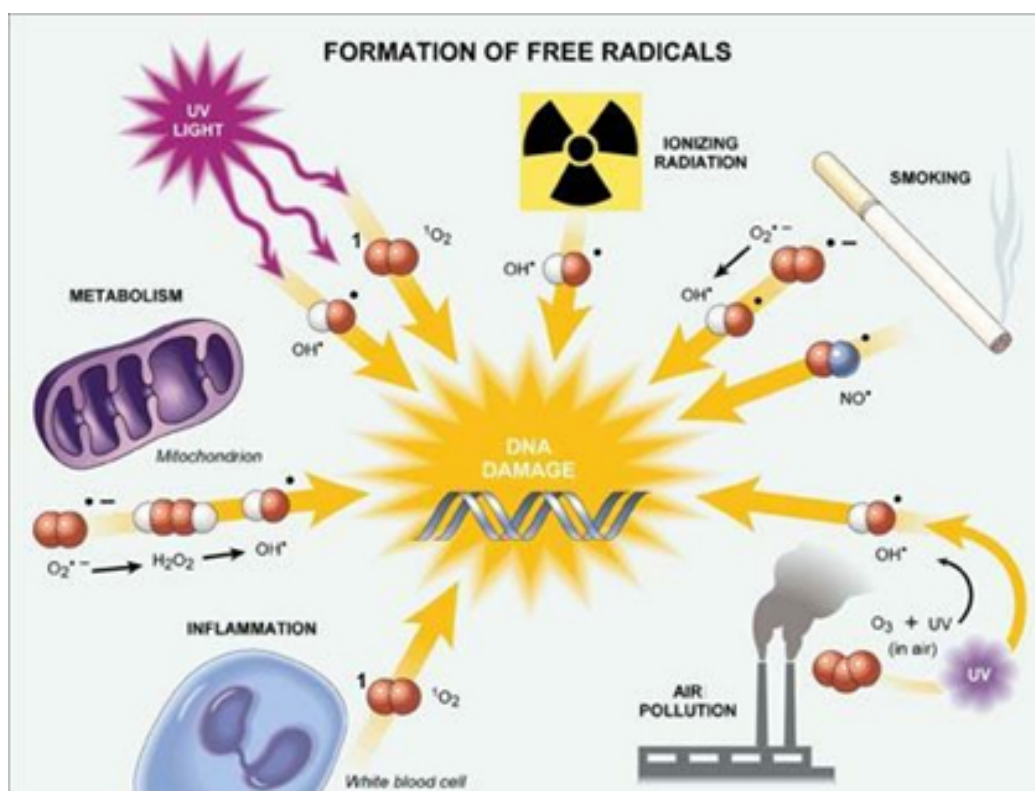
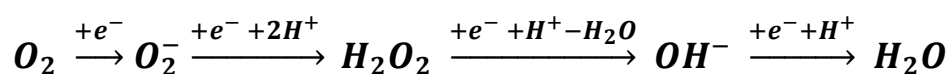
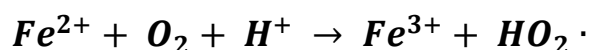


Схема 1. Пътица на формиране на ROS в организма. (по Alex-Zander, Human Aging Free Radical Theory)

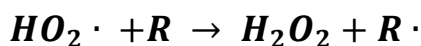
Активните форми на кислорода, както и свободни радикали, генерирани от различни фактори – и в норма и в патология, атакуват практически всички органични молекули в организма, като индуцират верижно разклоняващи се свободно-радикални реакции. Особено податливи на тези реакции са липидите, респективно клетъчните мембрани, в чиято структура те присъстват. Тъй като се включва постоянно молекулен

кислород, този процес се обозначава като прекисно окисление на липидите (ПОЛ). Състои се от множество верижно разклоняващи се свободно – радикални реакции, от които може да се получат различни междинни и крайни продукти в зависимост от вида на масните киселини, на фосфолипидите, както и от участието на други фактори. Един от процесите, който най – често е считан, че иницира деструктивни радикални реакции е *in vivo* разпадането на липидните хидроперекиси (ЛХП) (Niki et al., 2005; Farmer a. Mueller, 2013). Установено е, че полиненаситените мастни киселини (ПНМК) в липидите както чрез нормално автоокисление така и в резултат на ензимни процеси продуцират ЛХП (LOOH). Въпреки, че липидите са защитени от автоокисление чрез защитна белтъчна обвивка и/или от присъствието на високи концентрации на антиоксиданти като витамин Е, глутатион и др. малки количества ПНМК са подложени на автоокисление.

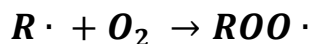
Окислението на метални йони с променлива валентност и особено редуцираните форми на желязо и мед от молекулния кислород също води до образуване на свободни радикали в една система:



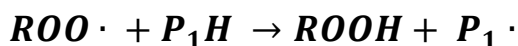
При взаимодействието на образувания супероксиден радикал $HO_2 \cdot$ с молекула ПНМК се образува липиден радикал:



Тези две реакции са началото на верижното окисление на ПНМК и се наричат стадии на иницирането на веригата. Ако в системата присъства кислород, с много висока вероятност е да протече взаимодействието:

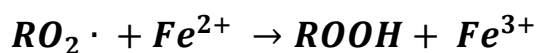


В резултат на това взаимодействие се образува прекисен радикал, който може да взаимодейства с нова молекула ПНМК:

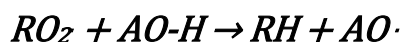


По този начин възникването на един единствен радикал в дадена система, съдържаща ПНМК, би могло да доведе до пълното превръщане на ПНМК в хидроперекиси при условие, че в системата има достатъчно кислород.

В действителност обаче не се достига до пълно превръщане на ПНМК в хидроперокси, тъй като рарикалите $R\cdot$ и $RO_2\cdot$ могат да реагират освен с молекулите на наличните ПНМК още и с други молекули, образувайки стабилни продукти, с метални йони с променлива валентност,



както и с молекули на антиоксиданти (АО)



Най-същественият процес за генериране на ROS в клетката е унивалентната редукция на кислорода. При нея се образуват супероксиден анион радикали ($O_2\cdot^-$), водороден пероксид (H_2O_2) и хидрооксилни радикали ($OH\cdot$). Всички тези продукти са прекалено реактивоспособни за да бъдат съвместими с живите системи. При това хидрооксилният радикал има най-висока реактивоспособност и реагира с органичните молекули още при първият контакт с тях. Тези радикали е очевидно, че трябва да бъдат много бързо неутрализирани още преди да са нанесли поражения на биологичните структури. Защитната функция в живите системи по отношение на ROS се осигурява от няколко ензима: супероксиддисмутаза, каталаза и различни пероксидази.

Отстраняването на супероксидни аниони и водороден прекис предотвратява образуването на хидрооксилни радикали. Този механизъм на защита е изграден в еволюционното развитие на организмите. Съществуват различни класификации на клетъчната антиоксидантна защитна система, но най-общо тя може да се подраздели на ензимна и неензимна.

Ензимната антиоксидантна защита на клетките е представена от ензимите супероксид дисмутаза (SOD), каталаза и пероксидази (Схема 2.).

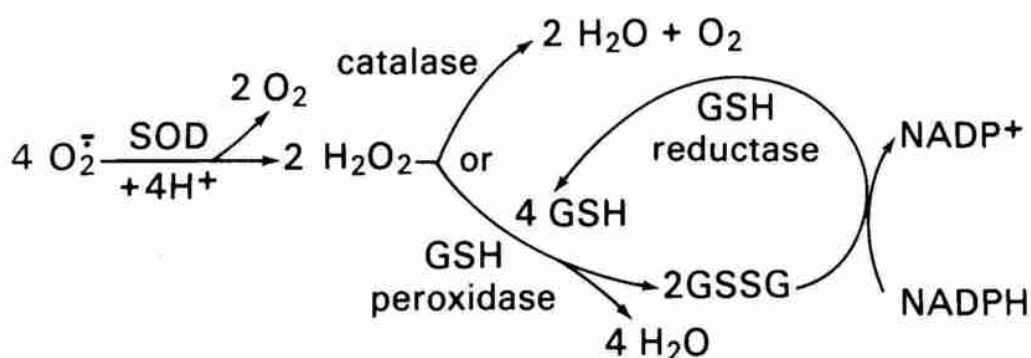


Схема 2. Обща схема на действието на антиоксидантните ензимни системи в организма. (по Proctor a. Reynolds, 1984)

Супероксид дисмутазата (SOD) е основен антиоксидантен ензим. Съществуват два вида супероксиддисмутази: съдържащи желязо или манган в активният си център и други, които съдържат едновременно мед и цинк.

Cu-Zn Супероксид дисмутазата

Тя е изключително стабилна. Открита е при всички еукариотни клетки. При животните е локализирана основно в цитозола, има я и в лизозоми, ядро, интермембранно пространство на митохондриите, пероксизоми. Установена е и при прокариоти - цианобактерии и др. бактерии. В каталитичния център се съдържа Cu, който не може да се замести с друг преходен метал. Zn не участва в каталитичния център, но стабилизира ензима и може да се замести с Co, Hg, Cd.

Mn-SOD, съответно съдържа манган в активния си център, който не може да се замести с друг метал, включително и с желязо. Разпространена е в бактерии, растения и животни. Най-често е в митохондриите, а в еритроцитите, където липсват митохондрии - отсъства. Mn-SOD е нестабилна при изолиране.

Каталаза

Среща се при повечето аеробни клетки. При животните – основно в черния дроб. В еритроцитите предпазва прекиса, получен от дисмутация на супероксида от автоокислението на хемоглобина (Hb). Локализирана е основно в пероксизоми, малко в митохондрии, ендоплазмен ретикулум.

Глутатион пероксидази (GPX)

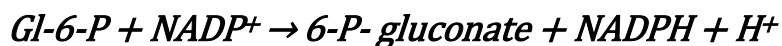
В структурно отношение те са изградени от 4 субединици с по 1 атом Se в активния център и съществуват поне 4 различни типа GPX. Те отстраняват пероксида чрез съвместяване на редукцията му до вода с окислението на глутатиона (GSH).

Глутатион редуктаза

Глутатионът спада към неензимната антиоксидантна система. Той е тиолсъдържащ трипептид (глутамин-цистеин-глицин) и го има при животни, растения и аеробни бактерии. Като антиоксидант освен кофактор на GPX, GSH играе роля при: метаболизма на аскорбата, предпазва белтъчните тиолови групи от окисление, участва във вътреклетъчния транспорт на Cu, хелатира медта и пречи на образуване на радикали, радиопротектор, редукция на дисулфидни мостове. GSH действа и като директен уловител на радикали: реагира с OH^+ , HOCl , оксинитрит, RO^{\cdot} , RO_2^{\cdot} , RC^{\cdot} и синглетен кислород – образува тиолов радикал.



NADPH се доставя основно от пентозофосфатния цикъл с участието на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа



В клетките се поддържа високо съотношение на GSH/GSSG с помощта на глутатион редуктаза.

Други клетъчни антиоксиданти са главно различни витамини: рибофлавин (Витамин А), токоферол (Витамин Е), аскорбинова киселина (Витамин С), и др. Като антиоксиданти се приемат такива химични съединения и елементи, които участват пряко в биохимичните процеси на деактивиране на свободните радикали и отстраняването им от клетката. Част от тях се образуват в организма, а други се доставят чрез храната – плодове, зеленчуци, ядки, зърнени храни, фармацевтични форми на витамини и микроелементи.

Антиоксидантите са вещества с добри редуциращи свойства. Получените техни радикали са с ниска реактивоспособност и не са способни да встъпват в реакции с нова молекула ПНМК и в резултат рано или късно изчезват при среща с друг радикал, като дават стабилни молекулни продукти.

По такъв начин от момента на възникване на свободен радикал в дадена система до момента на неговото изчезване се извършват няколко цикъла с участието на радикалите $R\cdot$ и $RO_2\cdot$ и на молекула кислород, при което се образува определен брой молекули хидроперексид. Именно този брой цикли характеризира дължината на автоокислителната верига.

При достатъчно високи концентрации на метални йони с променлива валентност е възможно и протичането на следната реакция:



Така възниква нов свободен радикал, който може да иницира нова верижна реакция. В такъв случай говорим за разклоняване на автоокислителната верига. Получените ферийони на са в състояние да иницират перексидно окисление. Те могат да взаимодействат със сулфхидрилни съединения и отново да се превърнат във феройони:



Този процес е описан и известен като регенерация на феройоните.

Всички разгледани до тук реакции – инициране, удължаване и разклоняване на веригата и прекъсване на свободно–радикалното окисление формират прекисното окисление на липидите, като основно изискване е наличието на достатъчни количества кислород.

Физиологичните и патологични различия в активността на антиоксидантните ензими в различните органи и тъкани се свързват с различни стойности на хидропрекисната концентрация в тях. Доколкото на кислородни модификации се подлагат преди всичко полиненаситените мастни киселини, следва да се очаква, че развитието на процеса на ПОЛ *in vivo*, ще се извършва в добре кръвоснабдени и аерирани тъкани; черен дроб, бъбреци, мозък, кръв. Процесът на ПОЛ води до изменения в състава на мембраната, а оттам в нейната структура и свойства. Натрупването на хидропрекиси също може да доведе до промяна в мембранните свойства – конформационни изменения във фосфолипидните и липопротеидни комплекси, което се проявява с изменения във физическите свойства на мембраната и ензимните функции на липопротеидните комплекси, разположени в или върху мембраната. Липидните радикали също могат да окисляват тиоловите и имидазолови групи и този процес се съпровожда от промяна на активността или модификация на мембранните ензими. Радикалите също атакуват и разрушават различни вещества, имащи антиоксидантни свойства: витамини, убихинони, стероидни хормони, естрогени и т.н. Вторичните продукти на прекисното окисление могат да взаимодействат с аминоксидни (NH_2) и сулфхидрилни (SH) групи като образуват вътре и междумолекулни връзки и по този начин инактивират различни важни в структурно и функционално отношение биомолекули.

При оксидативен стрес се нарушава баланса между образуваните и неутрализираните свободни радикали в следствие на което се получава увреждане на клетката – засягат се всички биомолекули: липиди, ДНК, протеини и това може да доведе до клетъчна смърт. Такъв дисбаланс се получава при въздействието на различни ендогенни и екзогенни фактори: патологични състояния – възпалителни процеси, заболявания, стрес, под въздействието на фактори на околната среда като замърсен въздух, радиация и др.

II.2.1.2. Neme oxygenase – индикатор за състояния на оксидативен стрес.

В момента са известни две изоформи на NO – NO-1, NO-2. NO-1 е индуцируемата форма на ензима (Otterbein et al. 2003). Тя се експресира при различни състояния на стрес - въздействие с тежки метали, УВ-радиация, хипоксия, хипероксия, ендотоксини, исхемия-реперфузия, донори на азотен оксид, висока температура и др. NO-2 е конститутивната форма на ензима и е експресирана в почти всички тъкани с изключение на някои области в ЦНС. В различните области на сърдечно-съдовата и други системи и органи присъстват както NO-2, така и NO-1 (Zang et al., 2001; Motterlini et al., 2002; Li et al., 2012). Освен това, NO се експресира и в ендотелните клетки на съдовете и гастро-интестиналния тракт.

Neme oxygenase-1 (NO-1) е ключов индуцируем компонент на клетъчния отговор към токсичността на NO. (Bishop, 2004). Дейността на NO-1 е необходима за основната устойчивост на клетките на бозайниците към NO-медираната цитотоксичност. Въпреки това, критичните NO-1-зависими реакции отговорни за някакво противодействие все още не са идентифицирани. Индукцията на NO-1 в отговор на NO зависи от ограниченото транскрипционно активиране, а в някои клетъчни типове, от драматично NO-индуцирано стабилизиране на mRNA NO-1. В човешки фибробласти, тази стабилизация се увеличава пряко със степента на NO експозиция. Функцията на NO-1 в областта на клетъчната резистентност към NO не е пряка. В катаболизма на хема, ензимът генерира свободно желязо, CO, и biliverdin (Tyrrell, 1997; Liu a. de Montellano, 2000). Билирубинът, редуцираният продукт на biliverdin, има антиоксидантни свойства (Stocker et al., 1987), които биха могли да допринесат за резистентност към NO, докато CO може да медира клетъчната резистентност към някои видове оксидативен стрес (Zhang et al., 2003). Освобождаването на желязо от NO-1 се предполага, че играе роля в резистентността към оксидативен стрес чрез увеличаване на синтеза на феритин (Tyrrell, 1997). Също така остава възможността, при третиране с NO да се освободи свободен хем, който може да действа като про-оксидант и в такъв случай защитата от NO-1 би се отразила на неговите известни катаболитни функции.

II.2.2. Влияние на оксидативния стрес върху съдовата гладка мускулатура.

Реактивни кислородни форми, като H_2O_2 , O_2^- и $OH\cdot$ се генерират в клетките по няколко пътя. O_2^- се генерира от изтичане на електрони от митохондриите. O_2^- също така се генерират от NADPH цитохром P450 редуктаза, хипоксантин / ксантин-

оксидаза, NADPH-оксидаза, липоксигеназа и циклооксигеназа. Супероксид дисмутаза преобразува O_2^- в H_2O_2 . H_2O_2 произвежда високо реактивен радикал $OH\cdot$ от реакциите на Фентън или Хабер-Вайс.

Три процеса, при които ROS има вероятност да играят патогенна роля в кръвоносни съдове са хипертония, атеросклероза и съдово ремоделиране. Връзки между оксидативния стрес и хипертония са били установени експериментално, а именно, че ангиотензин-II увеличава производството на ROS от VSMC (Griendling et al., 1994). Наскоро беше показано, че ангиотензин II - предизвиканата хипертония е свързана с повишено съдово производство на O_2^- и че лечението с липозом-капсулирана SOD понижава кръвното налягане с 50mm Hg в ангиотензин II инфузирани плъхове (Laurson et al., 1997). По същия начин, липозом-капсулирана SOD подобрява *in vivo* отговори на ацетилхолин и *in vitro* отговор на ендотел-зависими вазодилататори в ангиотензин II - третирани плъхове (Laurson et al., 1997). Тези резултати предполагат, че хипертония, причинена от хронично повишен ангиотензин II се осъществява частично чрез O_2^- , вероятно чрез разграждане на ендотелиалния NO. Инхибирането на NADH/NADPH-оксидаза (преобладаващият вътреклетъчен източник на O_2^-) ограничава VSMC хипертрофия стимулирана от ангиотензин II (Ushio-Fukai et al., 1996).

Повечето проучвания за ефекта на ROS и оксидативен стрес в съдове, са фокусирани върху коронарната, каротидната и церебралните артериални системни (Heitzer et al., 2001; Gagov et al., 2003; Guzik et al., 2004; Jacobson et al., 2003), по-специално на NAD(P)H-оксидазна активност (Görlach et al., 2000; Paravicini et al., 2002; Paravicini et al., 2004; Ellmark et al., 2005), ефект на оксидативния стрес върху ендотела (Johnson et al., 1996; Cai a. Harrison, 2000) и клетъчни култури (Marczin et al., 1992; Griendling et al., 1994).

Ефекти на много природни антиоксиданти за цитопротекция в съдове са изследвани от различни лаборатории. Растителни екстракти от гроздови семки и люспи (Monagas et al., 2005), листа от *Ginkgo biloba* (Chen et al., 1998; Bayar et al., 2003), антоциани (Mazza, 2007), зехтин (Waterman a. Lockwood, 2007) са били предложени за антиоксиданти и акцептори на свободни радикали. Повечето от тези растения не са обичайни за българската флора.

II.3. Общи сведения за организацията на стомашно-чревната и съдовата мускулатура.

II.3.1. Структура на стомашно-чревната мускулатура.

Стената на стомашно-чревния тракт е комплексна. Съставена е освен от гладкомускулни клетки, така и от нервни влакна, кръвоносни и лимфни съдове, фибробласти, шванови клетки, интерстициални клетки, колагенови и еластични влакна. Всички немускулни компоненти оказват голямо влияние върху нейното функциониране.

Гладкомускулните влакна са основният клетъчен компонент, който изгражда стените на органите от стомашно-чревния тракт. Размерите им са в границите: 2 – 6 μm диаметър (в областта на ядрото) и дължина 60 - 80 μm в контрахирано до 150 - 200 μm в релаксирано състояние. Влакната са обединени в снопове, обвити със съединителна тъкан. Тези снопове са основната морфологична единица на гладкия мускул, която обуславя моторната активност. Между отделните гладкомускулни клетки съществуват специализирани контакти, които имат голямо значение за функционирането на гладкия мускул като цяло. Те могат да бъдат разделени на три основни типа: междуклетъчни мостове, нексуси или “gap junctions” и десмозоми (Burnstock, 1970). Нексусите представляват морфологичната основа за предаване на електричната активност (респ. възбуждането) между клетките в рамките на мускулния сноп. Десмозомите поддържат механичния интегритет на тъканта по време на съкращение.

Muscularis externa е главният мускулен компонент в стените на стомаха и червата при гръбначните животни. *Muscularis mucosae* и мускулните компоненти на интрамуралните кръвоносни съдове формират т.нар. добавъчна мускулатура.

Мускулният слой (*muscularis externa*) е изграден от два основни пласта мускулатура: външен – надлъжен (лонгитудинален) и вътрешен – напречен (циркуларен). Те са разделени от не-мускулни компоненти. Наблюдават се и снопчета гладкомускулни клетки обвити от съединителна тъкан, които свързват двата пласта. Лонгитудиналният мускулен слой е по-тънък от циркуларния във всички отдели на стомашно-чревния тракт, като неговият относителен дял нараства в дистално направление.

Muscularis mucosae е много по-тънък от *muscularis externa*. В някои случаи е изграден само от 2-4 слоя клетки. Той също се подразделя на външен (с лонгитудинално ориентирани мускулни клетки) и вътрешен (от циркуларно ориентирани мускулни клетки) компонент. В някои отдели последният може да липсва.

Гладките мускули от стомашно-чревния тракт се инервират от вегетативната (автономната) нервна система. В началото на XX век Langley (Langley, 1920) разделя вегетативната нервна система на три части: парасимпатикова, симпатикова и ентерична нервна система. Ентеричната нервна система се състои от ганглии в стените на вътрешните органи, свързани с невроните на симпатиковия и парасимпатиковия дял.

Парасимпатиковия дял на вегетативната нервна система контролира работата на стомашно-чревната гладка мускулатура чрез преганглионарни нервни влакна, влизащи в състава на пелвичния и вагусовия нерви. Тези влакна проникват в стените на органите и достигат до ганглиите на миентеричния сплит. Оттам изхождат постганглионарни влакна които достигат до гладкомускулните клетки. Симпатиковата инервация на стомашно-чревната стена се осъществява от постганглионарни нервни влакна идващи от ганглии, разположени извън инервираните органи. Третият дял на вегетативната нервна система представлява нервна мрежа изградена от ганглии и междуганглийни сплитове, разположени във вътрешността на стените на органите в стомашно-чревния тракт и други вътрешни органи (**Схема 3**).

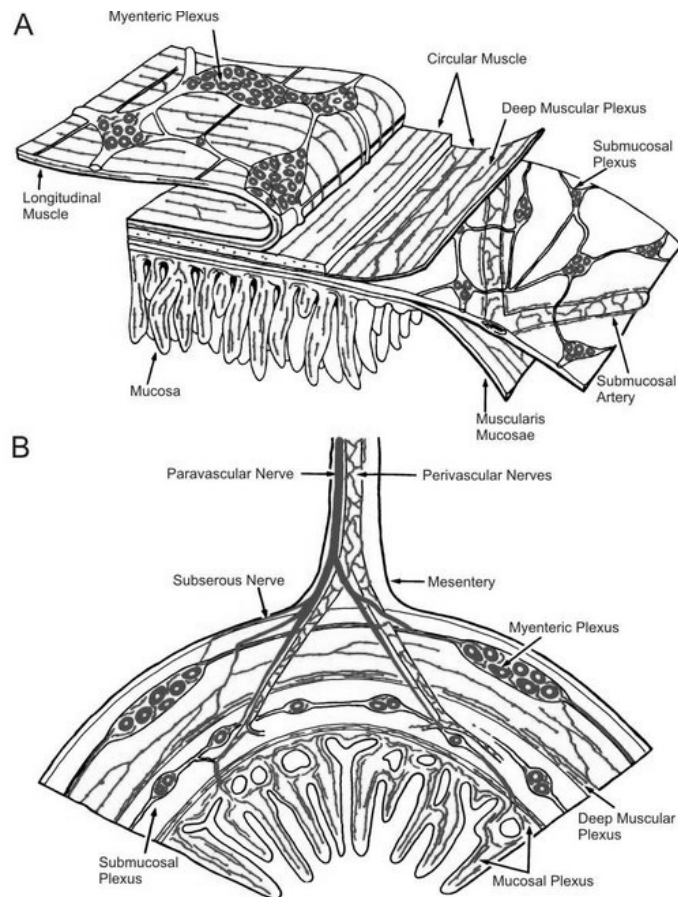


Схема 3. Подреждането на плексусите в тънките черва. А: вид в отделни слоеве. Миентеричният плексус, състоящ се от многобройни ядра и снопове нервни влакна свързване, се намира между надлъжните и напречните слоеве на мускулите. Вторият плексус е в субмукозата. Тези плексуси предоставят сплитове от нервните влакна в мускулите, в лигавицата и около артериоли. Б: Ентеричните плексуси в напречното сечение на червата (по Furness and Costa, 1980).

В зависимост от разположението си в стената на храносмилателния канал се различават няколко вида нервни сплитове (**Схема 3**).

Субсерозният сплит се намира непосредствено под серозната обвивка. Той съдържа малко ганглии и представлява връзката между навлизащите отвън нервни окончания и по-дълбоко разположени нервни плексуси. След него следва миентеричният плексус, разположен между лонгитудиналния и циркуларния мускулни слоеве. Той е съставен от много по-голям брой ганглии в сравнение с останалите нервни сплитове. Той интегрира информацията от нервните терминали навлизащи отвън, от сензорните неврони и интрамуралните интерневрони. Именно в този плексус се намират телата на по-голямата част от невроните, контролиращи съкратителната активност на стомашно-чревните гладки мускули. По-надолу в дълбочина следва дълбокия мускулен плексус, който подобно на серозния съдържа малко или не съдържа ганглии. Невроните, които го израждат се разполагат успоредно на направлението на

циркуларните мускулни влакна. Навътре към лигавицата следват субмукозният и мукозният плексуси, изградени от ганглии и нервни влакна. Те лежат съответно сред съединителната тъкан на субмукозата и мукозата и осъществяват нервен контрол над моториката на мускулните влакна на *lamina muscularis mucosae*.

На базата на своите функционални и фармакологични особености, невроните от ентеричната нервна система могат да се разделят на няколко основни типа (Furness a. Costa, 1980; Gwynne a. Bornstein, 2007):

- холинергични постганглионарни неврони. Техните аксони директно инервират гладкомускулните клетки;

- нехолинергични възбудни постганглионарни неврони, които инервират гладките мускули. Потенциални невротрансмитери са Субстанция Р (SP), серотонин (5HT);

- неадренергични нехолинергични (НАНХ) инхибиторни постганглио-нарни неврони, които инервират директно мускулните клетки. Потенциални невротрансмитери в тези неврони са азотен оксид (NO), вазоактивен интестинален полипептид (VIP), аденозин трифосфат (АТФ);

- ентерични нехолинергични възбудни интерневрони;

- ентерични НАНХ инхибиторни интерневрони.

Сложните взаимодействия между трите дяла на вегетативната нервна система стоят в основата на прецизна регулация на моториката на стомашно-чревната гладка мускулатура. Аксоните на мотоневроните формират последователно синапси с мембраните на сравнително малък брой мускулни клетки. По този начин само определен брой от тях директно се повлияват от освободените невротрансмитери (Burnstock, 1977). В последствие чрез специализираните междуклетъчни контакти възбудните процеси се предават до останалите мускулни влакна в рамките на мускулния сноп.

II.3.2. Структура на съдовата мускулатура.

Системата от кръвоносни съдове се състои от артерии, артериоли, капиляри, венули и вени. Структурата на съдовете в различните части на съдовата система е различна и различията са пряко свързани с функциите на всеки вид кръвоносен съд. Стените на всички кръвоносни съдове, с изключение на капилярите, които са еднослойни, имат едни и същи основни компоненти, но част от компонентите варират в зависимост от функцията (Схема 4).

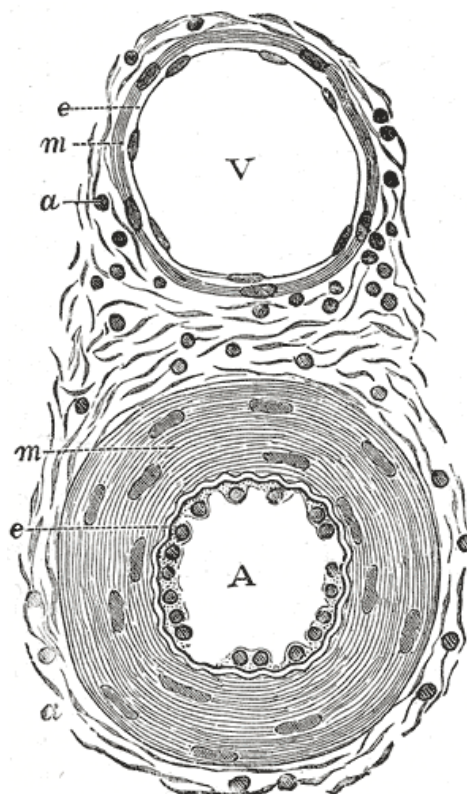


Схема 4. Напречен разрез през артерия и вена (x350). **А. Артерия:** виждат се ядрата на ендотелните клетки /*e*/. След ендотела е вълнообразната еластична пластинка. Основна част от стената на съда е заета от циркуларен мускулен слой – *Tunica media* /*m*/; ясно се виждат пръчковидните ядра на мускулните клетки. Навън от нея е *T. adventitia*. Тя се състои от снопове влакна от съединителна тъкан /*a*/. *T. adventitia* постепенно преминава в околната съединителна тъкан. **В. Вена:** показана е тънката ендотелна мембрана /*e*/, повдигната от *T. intima*. Поради своята деликатност, *T. media* се вижда като линия /*m*/. Последната се състои от няколко циркуларни мускулните клетки. *T. adventitia* /*a*/ е сходна по структура с тази на артерията. /по Gray, 1918/

➤ ***Tunica intima***

Очертава съдовата стена към лумена на съда и се състои от нейната ендотелна лигавица (обикновено проста, плоскоклетъчна) и свързаната с нея съединителна тъкан. Под съединителната тъкан се намира вътрешната еластична пластинка, която я очертава;

➤ ***Tunica media***

Състои се от различен по дебелина слой на циркуларно разположени гладкомускулни клетки и еластични влакна. Мускулните клетки се съкращават и релаксират, докато еластичните влакна позволяват разтягане и събиране на стената на съда. Втори слой от еластични влакна, външната еластична пластинка, очертава *tunica media*;

➤ ***Tunica adventitia***

Състои се предимно от съединителна тъкан и свободни колагенови влакна. Тя плавно преминава в съединителна тъкан около съдовете и ги прикрепва за околните тъкани.

Определянето на външната граница на *tunica adventitia*, следователно, е в известна степен произволно.

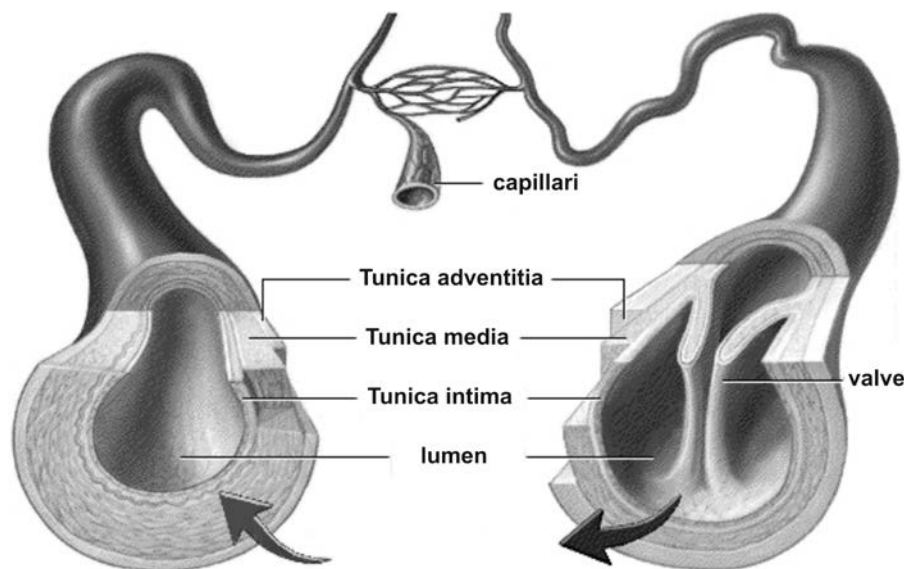


Схема 5. Сравнителна схема на устройството на артерия и вена. Отбелязана е по-голямата дебелина на *T.media* при артериите (1-2 mm) в сравнение с тази при вените (0.5-1.5 mm). Отбелязани са и клапите във вените, подпомагащи еднопосочният кръвен ток.

Големите (еластични) артерии, като аортата, са с най-еластични стени, така че те са в състояние да се разширяват и свиват в значителна степен (**Схема 5**). Мускулните артерии са с по-малко еластични влакна и имат намалена способност за разширяване и свиване. Артериолите нямат почти никакъв еластин, така че при тях пулсация отсъства. Капилярите се състоят само от тънка *tunica intima* или ендотел. Голяма част от капилярите са подредени в капилярни легла. Изтъняването на стените позволява обмен на вещества между кръвта и тъканите.

II.3.3. Характеристика на съкратителната активност на гладката мускулатура.

В основата, както на релаксацията, така и на съкращението на гладките мускули стоят промени във вътреклетъчната Ca^{2+} концентрация (Filo et al., 1965; Taylor a. Bywater, 1989; Walsh, 1994). Установено е, че покачването на вътреклетъчната концентрация на Ca^{2+} над 5×10^{-7} - 7×10^{-7} M води до съкращение (De Feo et al., 1985; Williams et al., 1987; Taylor a. Stull, 1988). То се предшества от образуването на Ca^{2+} -калмодулинов комплекс, активиращ калмодулин-зависимата киназа на леката миозинова верига (Walsh a. Hartshorne, 1983). От своя страна този ензим фосфорилира регулаторната верига на миозина, което води до активирането на актомиозиновата АТФ-аза и съответно до съкращение (Hartshorne, 1987; Jiang a. Stephens, 1994;

Horowitz et al., 1996). При понижаване на вътреклетъчната Ca^{2+} концентрация под нива от порядъка на 10^{-7} - $1,4 \times 10^{-7} \text{M}$, настъпва разпадане на Ca^{2+} -калмодулиновия комплекс, последвано от дефосфорилиране на миозина поради инактивирането на калмодулин-зависимата киназа на леките миозинови вериги от една страна и активирането на специфични фосфатази за леките миозинови вериги от друга страна (Pato et al., 1994; Walsh, 1994). В резултат на това настъпва инактивация на актомиозиновата АТФ-аза, последвано от релаксация на гладкия мускул (Gong et al., 1992).

Възбудно-съкратителното куплиране представлява система от процеси, протичащи в плазмената мембрана, която инициира гладко-мускулното съкращение. Авторите разделят възбудно-съкратителното куплиране на два основни типа в зависимост от това дали настъпват или не, промени в мембрания потенциал: електромеханично и фармакомеханично (Somlyo a. Somlyo, 1968; Himpens et al., 1995). Ca^{2+} играе водеща роля и в двата случая. При електромеханичното куплиране, в резултат на навлизането на естрацелуларен Ca^{2+} през потенциал-зависими Ca^{2+} канали, деполяризационни промени в мембрания потенциал водят до повишаване на вътреклетъчната Ca^{2+} концентрация (Duridanova et al., 1993; Klockner, 1996). Също така може да се предизвика и промяна на проводимостта на други потенциал-зависими йонни канали (Hara et al., 1986; Cole a. Sanders, 1989; Duridanova et al., 1997a; Duridanova et al., 1997b). Допълнително освобождаване на Ca^{2+} от вътреклетъчните Ca^{2+} депа, може да бъде предизвикано от своя страна от навлезлият през мембраната Ca^{2+} (Gagov et al., 1993a; Ganitkevich, 1996). Освободеният през IP_3 - и/или Ca^{2+} -зависимите вътреклетъчни Ca^{2+} канали на саркоплазматичния ретикулум вътреклетъчен калций също води до промени в мембрания потенциал чрез модулация на Ca^{2+} -чувствителната мембранна проводимост (Hu et al., 1989; Gagov et al., 1993b; Duridanova et al., 1997a).

За разлика от електромеханичното, при фармакомеханичното куплиране, активирането на мускулно съкращение се осъществява без задължителни промени в мембрания потенциал (Missiaen L, 1992). То се реализира посредством рецептор-предизвикано навлизане на извънклетъчен Ca^{2+} или чрез рецептор-предизвикано освобождаване на Ca^{2+} от вътреклетъчните калциеви депа (Missiaen et al., 1992), опосредствано от вторични посредници.

Съкратителната активност на гладката мускулатура на стомаха и червата стои в основата на моторната, резервоарната и евакуаторната функции на органите от стомашно-чревния тракт и е косвено свързана с процесите на секреция и абсорбция.

Гладките мускули проявяват два основни типа съкратителна активност - тонична и фазична (Somlyo a. Somlyo, 1968).

Тонична активност е характерна предимно за стомаха и то за областта на фундуса, обуславяща специфичната резервоарна функция на тази част от стомаха. Стомашният корпус проявява и тонична и фазична активност, като делът на втората нараства в посока към антрума. Антрумът и червата проявяват изключително фазична активност, свързана с евакуаторните им функции. И двата типа съкратителна активност са миогенно детерминирани (Boev et al., 1976; Mandrek a. Golenhofen, 1990) и се обуславят от мембранный контрол върху навлизането на екстрацелуларен Ca^{2+} , както и от освобождаването на Ca^{2+} от вътреклетъчните депа. Счита се, че тоничните контракции са свързани с навлизане на Ca^{2+} от екстрацелуларното пространство, тъй като бързо се подтискат при отстраняване на екстрацелуларния Ca^{2+} , докато вътреклетъчните калциевы депа са свързани с началните фазични контракции при стимулиране с агонисти, въпреки че при определени условия вътреклетъчният Ca^{2+} също е въввлечен в генерирането на тонични контракции (Lino, 1996).

Тоничните и фазичните гладки мускули от стомашио-чревния тракт се различават и по своята електрическа активност. Така например, фундусят на котка и морско свинче не проявява спонтанна електрическа активност (Atanassova et al., 1978; Velkova et al., 1979; Bauguinov a. Atanassova, 1981), а ЕПС води при тях до градуална деполяризация или хиперполяризация, съпътствани съответно от тонично съкращение или релаксация. Съществува, обаче, връзка между продължителността на деполяризацията и амплитудата и продължителността на съкратителния отговор (Papasova et al., 1977; Папазова, 1970, Velkova et al., 1979). За разлика от фундуса, спонтанната електрическа активност на корпуса, антрума и червата се характеризира с колебания в мембранный потенциал, известни като бавни вълни, като във всеки от тези отдели те могат да инициират фазни съкращения (Ichikawa a. Bozler, 1955; Atanassova et al., 1986; Papasova et al., 1979; Love a. Szurszewski, 1987; Ward et al., 1996). Промените в амплитудата и продължителността на тези колебания на мембранный потенциал са в пряка връзка със силата на контракциите.

По форма бавните вълни се различават в зависимост от вида на експерименталното животно и от тъканта. Така например при стомашен антрум на котка, куче и човек, а също тези при кучешки колон се наблюдават бавни вълни тип "плато", състоящи се от няколко фази: начална бърза деполяризация, последвана от бърза частична реполяризация, относително продължителна плато-деполяризация,

последвана от пълна реполяризация (Daniel, 1965; Papasova et al., 1968; Altaparmasov a. Papasova, 1976; Ward et al., 1996).

Съществуват различни схващания относно йонните механизми, обуславящи различните фази. Някои автори приемат, че началната бърза деполяризация се обуславя от навлизане през плазмената мембрана на Na^+ (Papasova et al., 1968; Voev et al., 1976). Все повече обаче, се налага схващането, че първата фаза се определя от навлизане на Ca^{2+} през потенциал-зависими Ca^{2+} канали (Bauginov et al., 1992; Suzuki et al., 1993; Sanders a. Publicover, 1994). Частичната реполяризация се дължи на инактивация на потенциал-зависимите Ca^{2+} канали, паралелно с активация на потенциал-зависимите K^+ канали. Плато-деполяризацията от своя страна, се обуславя от продължителна активация на потенциал-зависими Ca^{2+} канали, съпътствана от активация на Ca^{2+} -зависими K^+ канали (Ward et al., 1996). В някои случаи се наблюдава поява на спайк-потенциали, насложени върху плато-фазата на бавните вълни, водещи до увеличаване амплитудата на съкращението, предизвикано от базисния плато-акционен потенциал (Papasova et al., 1968; Daniel, 1965; Atanassova et al., 1978; Voev et al., 1976).

От друга, страна при някои стомашни гладки мускули, както и при повечето гладки мускули на тънките черва, бавните вълни имат проста синусоидална форма. Наслагването върху тях на спайк-потенциали предизвиква фазни съкращения (Papasova et al., 1981; Chihara a. Tomita, 1987). Счита се, че навлизането на Na^+ в клетката стои в основата на този тип бавни вълни, докато повишаването на мембранната пропускливост за Ca^{2+} обуславя бързата деполяризация на насложените спайк-потенциали. Реполяризацията им фаза се определя от потенциал- и Ca^{2+} -зависим K^+ -изходящ ток.

В съвременните научни изследвания най-широко се използва класифицирането на механизмите на Ca^{2+} -зависимо и Ca^{2+} -независимо съкращение (Harnett a. Biancani, 2003; Hilgers a. Webb, 2005; Berridge, 2008).

Както при скелетната и сърдечната мускулна тъкан, така и при съдовите гладки мускули в частност, съкращението на гладките мускули основно се регулира от цитозолната концентрация на калциевите йони (Ca^{2+}) (Hristov et al., 2004). Повишаването на цитозолната концентрация на свободния Ca^{2+} в отговор на мембранна деполяризация, рецепторна активация от различни агонисти или от разтягане, променящо проводимостта на механочувствителните йонни канали, е основният пусков стимул на гладкомускулното съкращение по Ca^{2+} -зависимия

електромеханичен възбудно-ефекторен механизъм (Himpens et al, 1995; Somlyo a. Somlyo, 1994; Allen a. Walsh, 1994). Това увеличаване на концентрацията на вътреклетъчен Ca ($[Ca^{2+}]_i$) от наномоларни нива до микромоларни нива (Lee et al., 2002) е сумарен резултат от навлизания в клетките екстрацелуларен Ca^{2+} (Himpens et al., 1995). То е следствие на промените в мембранната проводимост на клетката и освобождаването на Ca^{2+} -вторичен посредник от вътреклетъчните калциеви депа на саркоплазмения ретикулум чрез въздействието на IP₃. Последният се продуцира чрез активиране на фосфолипаза C (Bartlett et al., 2005). Втория основен продукт на споменатата хидролиза, осъществявана от фосфоинозитид-специфичната фосфолипаза C е диацилглицерол, който активира PKC-зависимата сигнализация (Bartlett et al., 2005). Нарастването на $[Ca^{2+}]_i$ в клетката води до свързването на Ca^{2+} с калмодулина, който е регулаторния протеин, свързващ повишената концентрация на Ca^{2+} с активацията на съкращението при гладките мускули (Walsh, 1994; Chin a. Means, 2000). Следващ етап в Ca^{2+} -зависимата сигнално-ефекторната клетъчна каскада е активиране на калмодулин-зависимата киназа на лека миозиновата верига от комплекса Ca^{2+} -калмодулин (Krueger et al., 1997). Киназата на миозиновата лека верига е ензим, който фосфорилира регулаторната лека верига. От своя страна това води до повишаване на актин-зависимата миозинова фосфатазна активност и като следствие се осъществява гладкомускулно съкращение (Hartshorne, 1987; Horowitz et al, 1996; Somlyo a. Somlyo, 1994; Allen a. Walsh, 1994). Намалването на вътреклетъчната Ca^{2+} -концентрация под едно критично ниво предизвиква дисоциация на Ca^{2+} -калмодулиновия комплекс, инактивиране на калмодулин-зависимата миозинова киназа и дефосфорилиране на миозина с помощта на специфична фосфатаза (Pato ey al., 1994, Walsh et al., 1995). Цикълът на гладкомускулно съкращение завършва с подтискането на актомиозиновата аденозин трифосфатаза и последваща мускулна релаксация (Gong et al., 1992). Както става известно през последното десетилетие, двата процеса (на намаляване на вътреклетъчния Ca^{2+} и дефосфорилирането на миозиновата лека верига) са независими събития, които се контролират по различни механизми (Lincoln, 2007).

Изследванията, провеждани през последните 15 години предоставят доказателства, че съкращението на съдовите гладки мускули е зависимо не само от директната Ca^{2+} /калмодулин- и медираната от киназа на миозиновата лека верига активация на актомиозиновото взаимодействие, но и от допълнителни механизми на регулиране на гладкомускулното съкращение. Основен такъв механизъм е калциевата сензитизация на контрактилните протеини (Hill et al., 2001; Somlyo a. Somlyo, 1994;

Somlyo a. Somlyo, 2000). Някои агонисти активират процеса на гладкомускулно съкращение чрез стимулиране на G-протеин свързаните рецептори, които индуцират фосфорилирането на миозиновата лека верига и съкращението, както чрез активирането на Ca^{2+} -зависимата киназа на миозиновата лека верига и активирането на Ca^{2+} -независимата протеинкиназа C, така и чрез активиране на RhoA, който стимулира Rho-киназата. Последните две протеин-кинази на свой ред подтискат дефосфорилирането на регулаторната лека миозинова верига, осъществявано от фосфатазата на миозиновата лека верига (Somlyo & Somlyo, 2003; Pfitzer, 2001). Тази вътреклетъчна сигнализация се осъществява без да се съпровожда от промяна на вътреклетъчната Ca^{2+} концентрация (Somlyo a. Somlyo, 2000). Инхибирането на фосфатазата на миозиновата лека верига води до „ Ca^{2+} сензитизация“, т.е. увеличаване на фосфорилирането на миозиновата лека верига и съответно увеличаване на силата на съкращението при дадени вътреклетъчни концентрации на Ca^{2+} (Somlyo a. Himpen, 1989; Kitazawa et al, 1989). При "десензитизацията" намалява чувствителността към Ca^{2+} регулацията върху моториката на стомашночревната гладка мускулатура и респективно съкратителния отговор на актомиозиновите комплекси.

По време на реализацията на съкращението, съдовите гладки мускули намаляват диаметъра на лумена на кръвоносните съдове и като краен резултат регулират кръвният ток и кръвното налягане (Hilgers a. Webb, 2005).

II.4. Регулация на съкратителната активност на стомашно-чревната и съдовата гладка мускулатура

II.4.1. Роля на НАНХ невромедиация

Механизмът на релаксация на стената на проксималната част на стомаха (фундус и проксимален корпус), така че да може да помества големи количества храна с ограничени увеличения в интралуменното налягане първоначално е бил наречен "адаптивна релаксация". Това включва, както интрамурални, така и вагусови рефлексни пътища, чиито инхибиторни неврони са винаги интрамурални. Първоначално, данните за вида на невротрансмитера, отделен от инхибиторните неврони са били противоречиви, но в момента азотния оксид (NO) и вазоактивния интестинален полипептид (VIP) се считат за най-вероятните медиатори. Някои изследвания показват, че аденозин трифосфат (АТР) може също да е въввлечен в тези процеси. Изглежда, че тези невротрансмитери са освободени съвместно от

инхибиторните моторните неврони и са отговорни за различни характеристики на релаксаторните NANC-отговори. NO (вероятно и ATP) е отговорен за бързото начало и първоначалното бързо развитие на релаксацията предизвикана от невроналната възбуда при ниска или висока честота, а VIP за дългия период на почивка, предизвикана от висока честота на активиране на невроните.

Първото доказателство, че стомашните гладки мускули релаксират в отговор на вагусова стимулация под въздействие на нехолинергични субстанции (в присъствието на атропин) се получава *in vivo* при котки и зайци (Langley, 1898). Промяната от атропин на въздействието на вагусова стимулация и никотин се наблюдава за първи път в изолирани нервно-мускулни препарати от стомаха на котка (McSwiney a. Robson, 1929; Ambache, 1951). Това е така поради факта, че вагуса съдържа едновременно възбудни (холинергични) и инхибиторни (адренергични) влакна, и че два отделни типа постганглийни парасимпатикови неврони функционират едновременно - холинергични и адренергични (Ambache, 1951). Инхибиторни моторни отговори на стомах са показани след трансмурална стимулация в присъствието на атропин (Paton a. Vane, 1963). В началото на 1960-те години, за първи път от Burnstock (1963), Burnstock и съавт., (1964) беше предложена концепция за неадренергичната нехолинергична (НАНХ) невротрансмисия където, в чревната гладка мускулатура на морско свинче, при нехолинергични условия, са показани инхибиторни junction-потенциали (JPs) устойчиви на bretylium (адренергичен невронален блокер). През същата година е установено, че релаксацията на стомах, предизвикана от вагусова стимулация при котки, третиран с атропин, не се повлиява от адренергични невронални блокери (Martinsin, 1965). Макар инхибиторните моторни отговори да не са били повлияни от резерпин, Paton и Vane (1963) приписват релаксацията на стомаха на морско свинче, причинена от трансмурална стимулация, на освобождаването на норадреналин от адренергични миентерични неврони. Оттогава, обаче стана ясно, че отговорен за този вид отговор е неадренергичен невротрансмитер. Скоро концепцията за НАНХ-инхибиторна моторна невротрансмисия се утвърждава. От края на 1960-те години, НАНХ-инхибиторни моторни отговори бяха доказани не само в стомашно-чревния тракт на много видове, включително човека, но също така и в отделителната, дихателната и сърдечно-съдовата система (Burnstock, 1969; Benneth, 1997; Voeckxstaens a. Pelckmans, 1997).

След първата демонстрация на инхибиторни НАНХ моторни отговори, последва дългогодишен дебат за същността на НАНХ-невротрансмитерите. Дълго време АТР и VIP са били най-възможните кандидати. До края на оседесетте години на XX век се формира силен конфликт между застъпниците на "пуринергичната" или "VIP-ергичната" хипотези. По това време, откриването на азотния оксид (NO) го поставя като най-възможен невротрансмитер, освобождаван от инхибиторни моторни неврони в повечето системи, включително стомашно-чревния тракт. В момента има общо съгласие, че различни невротрансмитери се освобождават едновременно от инхибиторните моторни неврони, като NO (Toda a. Herman, 2005; Krumenacker et al., 2004; Garthwaite, 2008), VIP (Fahrenkrug, 1993; Shuttleworth et al., 1995) и АТР (Burnstock G, 1972; Burnstock, 1986) са най-важните. По-специално, изглежда, че те имат различни роли в стомаха - NO (вероятно и АТР) медира бърза, краткотрайна релаксация, а VIP отговаря за последващи, устойчиви релаксаторни отговори (Citrò a. Preziosi, 1998).

NO получен при реакция, катализирана от NOS е утвърден вече трансмитер в централната, периферната и ентеричната нервна система. В ентеричната нервна система той действа като вътреклетъчен инхибиторен невротрансмитер достигайки от невроните до близките гладкомускулни клетки, където активира sGC, резултиращ в мускулна релаксация.

Високи нива на NO се използват както цитотоксично оръжие по време на възпаление (MacMicking et al, 1997). Клетъчна резистентност към NO може да се увеличи чрез предварително излагане на сублетални нива на NO за предизвикване на протективна генна експресия (адаптивна резистентност към NO). NO играе важна роля в невронните увреждания (Radi et al., 2002; Sharma et al., 1996; McDonald, 1999) и евентуално в патологията на различни невродегенеративни заболявания, като болестта на Паркинсон, амиотрофична латерална склероза и болестта на Алцхаймер (Beckman et al. 2001; Taylor et al., 2002; Hyun et al., 2002; Chou et al., 1996; Beckman, 1996). Азотният оксид уврежда много от най-важните биологични макромолекули. NO уврежда ДНК чрез формиране на различни лезии (Tamir et al., 1996) и е мутаген, който може да подпомогне канцерогенезата (Zhuang et al., 1998). NO и NO⁻ зависими продукти като перохунитрит (ONOO⁻; формиран от NO при реакция със супероксид) също уврежда липиди и протеини (Beckman, 1996; Mehlhase a. Grune, 2002). NO, специално, нитрозилира протеинови центрове в хема, което резултира в митохондриална дисфункция и генериране на допълнителни цитотоксични свободни радикали (Radi et

al., 2002; Boyd a. Cadenas, 2002). NO-зависимо нитриране на тирозинови остатъци нарушава структурата на белтъка и функцията му, както е установено при масивно неврофиламентно разстройство в моторни неврони на пациенти с амиотропна латерална склероза (Chou et al., 1996; Beckman, 1996).

II.4.2. Роля на въглеродният оксид в съкратителната активност на гладката мускулатура

Въглеродният оксид се образува и ендогенно в тъканите на бозайниците. Той се получава от разграждането на хема в реакция, катализирана от микрозомалния ензим Heme oxygenase (HO). CO се съдържа както в тъканите на централната нервна система, така и в други не-невронални структури.

В резултат на HO-реакция – окислението на хема, се получават еквимоларни количества биологично-активни вещества – въглероден оксид, желязо и biliverdin (Схема 6).

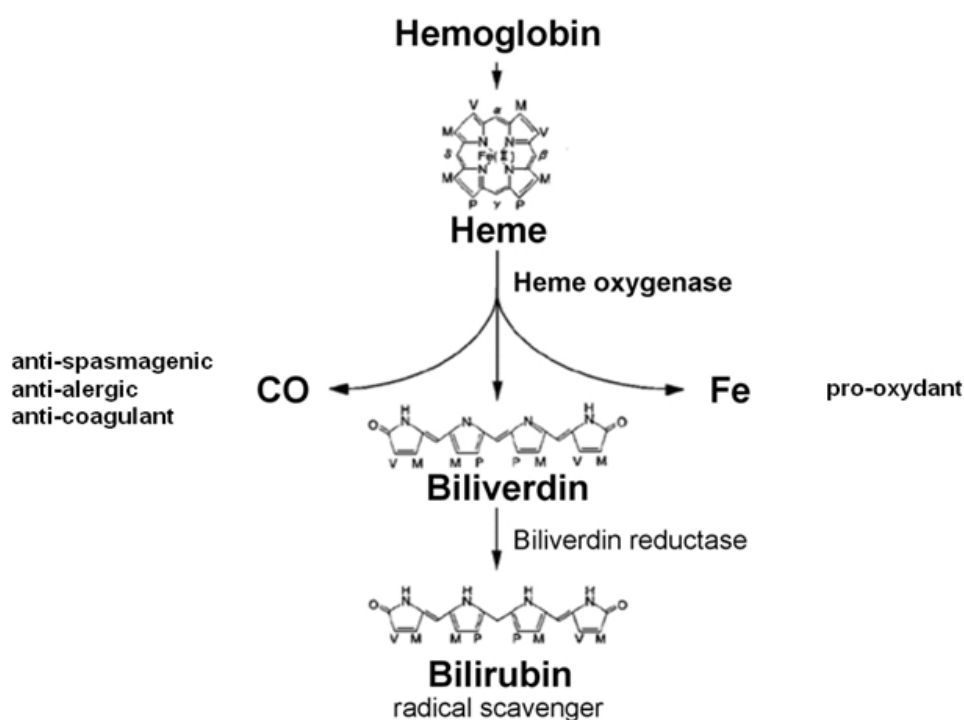


Схема 6. Схема на катализираната от HO реакция, при която се получават еквимоларни количества CO, Biliverdin/Bilirubin и Fe II./по Ryter, 2006/

Желязото може да се включи в синтеза на нов хемоглобин или да действа като регулатор както на генната експресия, така и на други процеси в клетката. Биливердинът действа като мощен вътреклетъчен антиоксидант.

Въглеродният оксид може да се свърже с циркулиращия хемоглобин и да се транспортира като карбоксихемоглобин до белите дробове и да се отдели чрез дишането. На вътреклетъчно ниво въглеродният оксид активира sGC, което води до повишаването на cGMP и последваща релаксация на гладките мускули.

Малко на брой проучвания са изследвали присъствието и активността на NO и ефектите на CO в стомашно-чревния тракт. NO-2 е локализирана предимно в ентерични неврони в различни дялове на стомашно-чревния тракт, в мукозата и клетките на Кахал в тънки черва от мишка.

Експресията на ензима най-добре се доказва с имунохистохимични методи, респективно със специфични антитела за всяка от изоформите. Предимството на този метод е неговата специфичност. Той позволява проследяването и локализацията на интрацелуларното разпределение на ензима в тънки тъканни срезове.

II.4.3. Въглеродният оксид – модулатор на съкратителната активност на гладките мускули

NOS и NO са локализирани в тънко черво от мишка (Zakhary et al., 1997) и в аноректум от опосум (Battish te al., 2000). В допълнение към това, knock-out мишки за гени на NO-2 и nNOS проявяват силни изменения на съкратителната активност (намаление на мускулната релаксация и инхибиторната невротрансмисия), показани от (Xue et al., 2000). Освен това бе показано, че NANC-релаксацията при такива животни се редуцира значително, в сравнение с нормални животни (Zakhary et al., 1997).

NANC-невроните, специфични за ентеричната нервна система медиат релаксацията при гладките мускули от фундус на стомах. Поради колокализацията на NO-2 и nNOS в някои ентерични неврони, техните продукти, съответно CO и NO биха могли да действат едновременно като невротрансмитери (Ny et al., 1997).

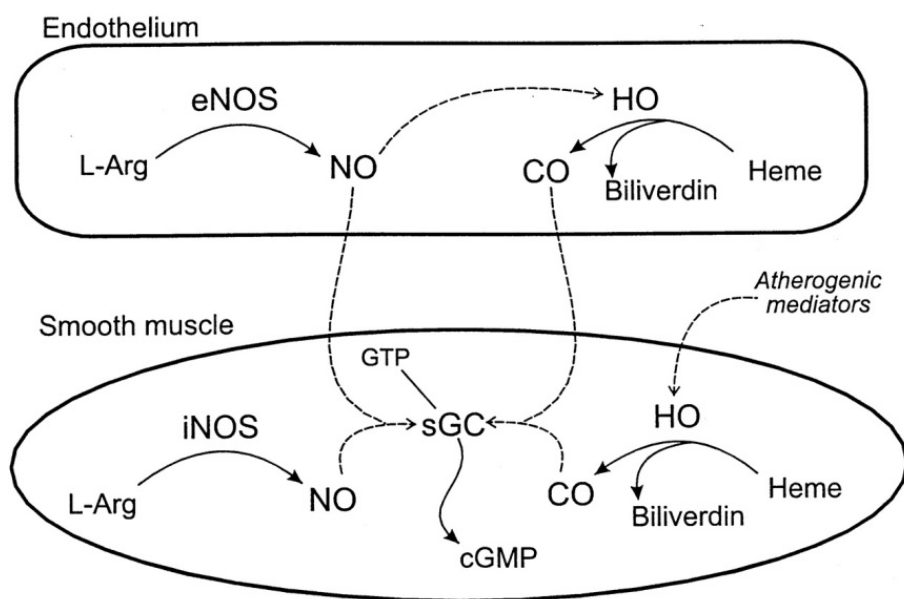


Схема 7. Значение на HO/CO и L-arginine / NO сигнални пътища в съдовите ендотелни и гладкомускулни клетки в атерогенезата /по Ny et al., 1997/.

Хем оксигенази (HO) метаболизират хема за генериране на антиоксиданти biliverdin и въглероден оксид (CO), който както азотния оксид (NO), стимулира разтворимата гуанилат циклаза (sGC), което води до увеличаване на вътреклетъчните нива на cGMP (**Схема 7**). Атерогенните и про-възпалителни медиатори намаляват експресията и активността на ендотелната азотно окисна синтаза (eNOS) и индуцират HO-1 и индуцируемата азотно окисна синтаза (iNOS) на гладката мускулатура. Намалената производителност или дейност на NO от ендотела в атерогенезата могат да бъдат компенсирани от индуциране на HO-1. Повишените нива на cGMP в гладката мускулатура поддържат кръвния поток, а разграждането на хема и генерирането на biliverdin ще намаляват оксидативния стрес при клетъчната атерогенеза.

Някои автори (Vesely et al., 1998) показват и възможността хемът и азотният оксид да бъдат значими регулатори на индуцируемата HO – HO-1 и превръщането на хема в скелетни мускули *in vivo*.

II.5. Заключение

Има убедителни доказателства, че СО се освобождава по време на разграждането на хема и че освободението на СО може да увеличи cGMP. Въпреки това, според установените критерии, един невротрансмитер, наред с други проявени качества, трябва да предава сигнала през синапс. Въпреки че са представени убедителни доказателства за ефекта на СО върху невротрансмисията, той трябва да бъде третиран само като предполагаем, но не като доказан невротрансмитер. Доказано е, че ендогенно произведен СО упражнява биологични ефекти. Ако те са важни физиологични ефекти, може да се предположи, че дефицит на ендогенно генериран СО може да се прояви като болестно състояние или да влоши съществуващи заболявания. Съдовия NO е от значение при поддържане на съдовия тонус и неговият дефицит може да доведе до хипертония или тромбоцитна агрегация. Заболявания, предизвикани от недостиг на хормони или невротрансмитери се облекчават от заместителна терапия. Няма причина да мислим, че екзогенен СО не може да замени дефицит на ендогенен СО. Например, дефицит на ендогенен СО увеличава киселинно-зависимия жлъчен поток, като това може да бъде повлияно и коригирано от екзогенен СО (Shinoda et al., 1998; Suematsu et al., 2000). Механизмите на действие, участието и влиянието върху модулирането на НАНХ-невротрансмисията на въглеродния оксид, както и взаимодействието му с други невротрансмитери все още не са достатъчно добре проучени.

III. Цел и задачи

Целта на настоящата работа е изследване ефекта на въглероден оксид (CO) върху моторната активност на изолирани висцерални мускулни препарати. За постигането на целта бяха поставени следните задачи:

1. Индуциране на оксидативен стрес в експериментални животни *in vivo* чрез въздействие с тежки метали
2. Индуциране на оксидативен стрес в гладкомускулни препарати *in vitro* чрез въздействие с водороден пероксид
3. Изследване ефекта на ендогенен въглероден оксид върху съкратителната активност на гладкомускулни препарати от храносмилателната система на морско свинче
4. Изследване ефекта на ендогенен въглероден оксид върху съкратителната активност на гладкомускулни препарати от съдовата система на морско свинче и плъх
5. Изследване взаимодействието между въглероден оксид и азотен оксид във висцерална мускулатура

IV. Материали и методи

Експериментите бяха проведени върху нишковидни препарати от фундус на морско свинче, сегменти от тънко черво на морско свинче и сегменти от кръвоносни съдове на морско свинче и плъх. Експерименталните програми са провеждани в съответствие с изискванията на Етичната комисия към Институт по Невробиология - БАН.

IV.1. Обекти на изследване

Мъжки полово зрели морски свинчета (200 – 400 g) и плъхове (200 - 250g) бяха умъртвявани чрез зашеметяване (удар по тила), последвано от обезкръвяване или декапитация.

За експериментите със стомашен фундус коремната кухина се отваря по *linea alba*, след което се изважда целият стомах и се поставя във вана с модифициран разтвор на Кребс, като се почиства от съединителна и мастна тъкан. От областта на фундуса се отпрепарират нишковидни гладкомускулни препарати (2mm/15mm, без мукоза) по направление на циркуларния мускулен слой.

За експериментите с тънко черво коремната кухина се отваря по *linea alba*, след което се изважда участък от тънкото черво (5 - 10 cm дължина) на разстояние 10 cm проксимално от илео-цекалния сфинктер. Взетият материал се поставя във вана с модифициран разтвор на Кребс, след което се промива внимателно с разтвор на Кребс и се почиства от съединителна и мастна тъкан. От взетия материал се отпрепарират по 4 сегмента с дължина 10 mm.

За експериментите с кръвоносни съдове се изолират съдови сегменти от базиларна артерия (*a. basilaris*), коронарна артерия (*a. coronaris*) и очна артерия (*a. ophthalmica*), които се поставят за 20 min в леден модифициран разтвор на Кребс.

IV.2. Методи на изследване

IV.2.1. Метод на индуциране на оксидативен стрес с тежки метали

Мъжки морски свинчета с тегло 400–500 гр. бяха инжектирани подкожно с CoCl_2 , разтворен в 1ml физиологичен разтвор при концентрация 80 mg kg^{-1} , 22–24 h преди умървяването. В деня на експериментите, животните бяха умъртвявани чрез зашеметяване (удар по тила), последвано от обезкръвяване. Експресията на НО беше проверена биохимично както в изследваната тъкан, така и в черния дроб за да се гарантира, че процедурата по индуциране на оксидативен стрес е довела до

индуциране на НО. Причината за тази допълнителна проверка е липсата на данни за *in vivo* индуциране на НО при морски свинчета.

IV.2.2. Метод на индуциране на оксидативен стрес с водороден пероксид (H_2O_2)

В зависимост от експерименталния протокол, оксидативен стрес *in vitro* беше индуциран чрез кумулативно добавяне на H_2O_2 в концентрации 0.1 до 5 mM за 5 минути или чрез еднократно третиране с определените концентрации, 5 минути преди въздействие с полева електрическа стимулация или други субстанции. След трикратно промиване на препаратите с чисти разтвори се възстановяваха контролните отговори.

IV.2.3. Имунохистохимичен метод за доказване на Neme oxygenase

За имунохистохимично изследване мъжки морски свинчета (контролни и третирани с $CoCl_2$) бяха умъртвявани както е описано по-горе. Фундусът от стомах беше разделен на няколко парчета и те незабавно бяха фиксирани, като бяха поставяни в 4% параформалдехид и 0,15% пикринова киселина ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), фосфатен буфер (PB), pH 7.3 за 24 часа при температура от 4°C . Някои от парчетата бяха вградени в парафин. Срезове (5 μm дебелина) бяха монтирани върху предметни стъкла покрити с хром стипца, депарафинизирани в xilol, дехидратирани в степенувани серии етанол и измити с $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ фосфатен физиологичен разтвор (PBS). Други парчета бяха измити в захароза (20% разтвор на $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS). Последователни 30 μm дебели срезове от мускулния слой на фундуса бяха изготвени на "Reichert Yung" замразяващ микротом и се събираха в разтвор на захароза. Те бяха измивани многократно в PBS. Свободни депарафинизирани срезове, монтирани върху предметно стъкло, бяха изследвани за НО-1 и НО-2, като се използва процедурата за непряко имунохистохимично оцветяване. Всички инкубации бяха проведени при стайна температура. Срезове бяха третирани с 0,3% H_2O_2 в метанол в продължение на 20 минути и инкубирани с нормален 10%-ен кози серум (NGS) в PBS в продължение на 1 час, изплакнаха се с PBS и след това се инкубираха за една нощ в съответния първичен антисерум. Бяха използвани миши моноклонални анти-НО-1, и заешки поликлонални анти-НО-2 антисеруми (и двата в концентрация 1: 500, разтворен в 1% NGS в PBS). Antimouse IgG-биотин, antirabbit IgG-биотин и streptavidin-HRP бяха прилагани в съответствие със стандартния протокол. Имунореактивността беше онагледена чрез инкубиране на срезове с 0.05% 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemicals Co.) 0,003% H_2O_2 в $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ Tris/HCl буфер с pH 7,56 за 4-8 минути. Някои от срезове бяха негативно оцветени с хематоксилин, обезводнени в етанол и

ксилол, монтирани с Entellan, и бяха изследвани под светлинен микроскоп. В контролните групи инкубацията с първичния антисерум не беше проведена. Резултатите от тези контролни групи бяха отрицателни. Цветните снимки на изследваните проби бяха заснети с цифров фотоапарат, като интензитета на оцветяване в гладкомускулния слой беше анализиран с помощта на Corel Draw софтуер. Данните получени от NO-1 оцветени групи бяха сравнени между третирани и нетретирани животни, след приспадане на фоновото (имунонегативно) оцветяване и представляват средна стойност между 20 различни среза (30 μm дебелина).

IV.2.4. Хистохимичен метод за доказване на NADPH

Редуцираната нукотинамид аденин динуклеотид фосфат-диафороза (NADPH-d) и Ca^{2+} /калмодулин-зависимият ензим NOS участват в образуването на NO чрез превръщането на L-arginine в цитролин. В тази реакция NADPH е ко-субстрат. Така че, NOS-съдържащите структури могат морфологично да се визуализират чрез хистохимична техника за оцветяване на NADPH-d.

Препаратите за изследване на NADPH-диафороза са промивани за 30 min в 0.1 M Tris-HCl буфер с pH 7.4 и 0.8% Triton X-100, след което са инкубирани за 120 min при температура 37°C в 10 ml 0.1 M Tris-HCl буфер с pH 7.4, съдържащ 65.4 mg редуциран β -NADP и 10 mg nitroblue tetrazolium. Контролните препарати са инкубирани без субстрат или електронен акцептор, при което не се визуализира диафоразната реакция.

След края на реакциите срезовете са промивани в PBS, монтирани върху хром-желатинирани предметни стъкла, изсушени на въздух за 24 h, дехидрирани чрез възходяща редица алкохоли, просветлени с ксилол покривани с покривни стъкла с Entellan.

За микроскопските изследвания е използвано следното оборудване: светлинен микроскоп Jenaval (Germany) и светлинен микроскоп Nikon и дигитална камера Cool pix 4.500, Nikon (Japan). Фотодокументацията е съхранена в TIF формат и оптимизирана за контраст и яркост със софтуерна програма Adobe PhotoShop CS3.

IV.2.5. Метод за регистриране на съкратителна активност на гладкомускулни препарати.

Гладкомускулните препарати се монтираха вертикално в термостатирани органични вани с обем 10 ml (Схема 8), съдържащи модифициран разтвор на Кребс (pH 7.4) без CaCl_2 (за пълна релаксация), който се аерираше непрекъснато с газова смес (95% O_2 , 5% CO_2). Във всяка вана се монтираше по една нишка.

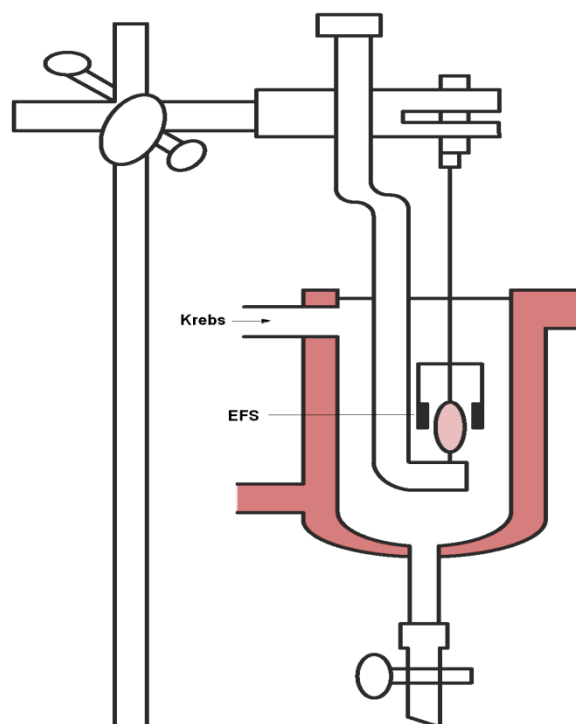


Схема 8. Схема на органична вана за изследване на електрически-предизвикани моторни отговори.

Съкратителната активност на гладкомускулните препарати се регистрираше изометрично с помощта на тензометрични датчици, свързани чрез тензометричен мост (Microtechna 1000, Чехия) с пишещо устройство (TZ 4620, Чехия). Част от експерименталните данни се регистрираха с компютризирана *on-line* система и се записваха чрез компютърна програма (Tenzo, България). Тридесет минути след монтиране във ваните, хранителният разтвор без CaCl_2 се сменяше с разтвор, съдържащ 2.5mM CaCl_2 . След стабилизиране на тензията препаратите бяха натоварвани с тежест еквивалентна на сила 10 mN, след което бяха адаптирани в продължение на 60 min, В този период работният разтвор във ваните се сменяше с пресен аериран разтвор на всеки 20 min. Беше използвана електрическа полева стимулация (ЕПС) чрез два успоредни платинови електрода на разстояние 2.5 mm от

препаратите, със следните параметри на стимулите: правоъгълни импулси с продължителност 1 ms, напрежение 50V, 20 s продължителност на стимулацията, честота 2 Hz и 5 Hz. Интервалът между различните честоти беше 3 min през 30 min. Неврогенно-независимият тонус беше отчитан в присъствието на TTX ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), а индуцираният от ЕПС – в присъствие на atropine ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) върху индуциран с PGF2 α тонус, тип - плато. Моторните отговори на гладкомускулните препарати бяха изчислявани като процент от максималния тонус след смяна на разтвора с CaCl₂ и базалното ниво на тонуса при отсъствие на CaCl₂.

IV.2.6. Метод за изолиране на *a. coronaris*.

Сърцето беше експлантирано в рамките на 2 min тялото на лабораторното животно след умъртвяването му. Под бинокулярна лупа беше фиксирано и внимателно беше отстранявано дясното предсърдие. *A. coronaris* заедно с част от съединителната тъкан, първо внимателно беше дисектирана от сърцето на границата между предсърдието и камерата. След това съединителната тъкан беше отстранявана с помощта на фини ножици и пинцети, до получаване на изчистен кръвоносен съд. Отпрепариранията артерия се съхраняваше в леден PSS-разтвор за съхранение на съдове за 20 min. След този период сегменти *a. coronaris* се монтираха на жичковия миограф.

IV.2.7. Метод за изолиране на *a. basilaris*

В рамките на 10 min след умъртвяването му, от черепа на лабораторното животно беше екстирпиран мозъка. За целта след отстраняване на теменните кости, мозъкът внимателно беше повдиган с шпатула във фронталната му част с цел прерязване на черепно-мозъчните нерви и *n. opticus*. Целта беше да се предпазят от увреждане мозъчните обвивки в основата на мозъка, като по този начин се предпазваше и намиращата се там *a. basilaris*. Под бинокулярна лупа съответните мозъчни обвивки се отстраняваха и *a. basilaris* внимателно се дисектиреше от основата на мозъка с помощта на фини ножици и пинцети. След това отпрепариранията *a. basilaris* се съхраняваше в леден PSS-разтвор за съхранение на съдове за 20 min. След този период сегменти артерията се монтираха на жичковия миограф.

IV.2.8. Метод за изолиране на *a. ophthalmica*.

Лява и дясна очна ябълки (между експериментите те се изследваха в случаен порядък) бяха екстирпирани в рамките на 5 min от черепа на лабораторното животно след умъртвяването му. Под бинокулярна лупа съответните *a. ophthalmica* заедно с част от съединителната тъкан първо внимателно се дисектираха от очната ябълка и *n.*

opticus. След това съединителната тъкан беше отстранявана с помощта на фини ножици и пинцети, до получаване на изчистен кръвоносен съд. Отпрепарирани артерии се съхраняваха в PSS-разтвор за съхранение на съдове за 20 min. След този период сегменти от тези съдове се монтираха на жичковия миограф. Всички манипулации със съдовите сегменти се извършваха в ледени разтвори с цел намаляване негативните ефекти от физическите манипулации с тъканите.

IV.2.9. Метод за регистриране на съкратителна активност на съдови сегменти.

Монтиране на съдовите препарати

Артериалните съдови сегменти с дължина 1.8 – 2 mm, след като бяха дисектирани свободни от обкръжаващите ги тъкани (мастна и съединителна), бяха монтирани върху две жички от неръждаема стомана с дебелина 40 μ m в разтвор със същия състав като този, в който бяха изолирани. Монтираните препарати бяха прикрепени с винтове за стоманени челюсти в органа ваничка с контролиран обем на жичков миограф (model 300A, JP Trading, Denmark) (**Схема 9**), съдържаща модифициран разтвор на Кребс (PSS за съкратителни изследвания) с рН 7.4, който се аерира непрекъснато с газова смес (95% O₂, 5% CO₂). Едната челюст е свързана с микрометър, който нагласява разстоянието между двете жички, а втората жичка се монтира на втора челюст, свързана с пиезоелектричен тензометричен датчик. Накрая съединително-тъканни и мастни остатъци около съда бяха внимателно отстранявани с помощта на фини ножичка и пинсети. Процедурата по дисецирането на артериалните препарати и монтирането на сегментите на апарата продължаваше средно 1 час (Mulvany, 1977) и протичаше при температура на работните разтвори 2 - 4°C.



Схема 9. Схема на експериментална постановка за регистриране на изометрично съкращение на малки съдове с жичков миограф (model 300A, JP Trading, Denmark).

При експериментите с деендотелизирани препарати, ендотелът се отстраняваше с помощта на косъм от мустак на плъх чрез внимателно ит랄уменно остъргване.

След това работният разтвор във ваничката се сменяше с такъв с концентрация на CaCl_2 2.5 mM или 1.5 mM в зависимост от изследвания съд.

Нормализация

Монтиран, съдът се оставя да се еквилибрира във ваничката за 30 min в среда на PSS със същия състав като разтвора за изолиране и монтиране на препаратите и 2.5 mM CaCl_2 при 37°C, и непрекъснато аериране с карбоген (95% O_2 и 5% CO_2). След 30 min еквилибрационен период, съдовият препарат беше нормализиран до пасивна тензия еквивалентна на тази, която е необходима да продуцира 90% от техния диаметър (диаметър D_{100}), когато съдът е изложен на презстенно налягане от 100 mmHg (Mulvany & Halpern, 1977).

По същество, процедурата по нормализация представлява следното: намирайки се в началото в напълно ненатоварено състояние, препаратите бяха инкрементно разтягани чрез раздалечаване на двете жички, на които беше монтиран артериалния съд. Всяка стъпка на разтягане продуцираше увеличаване на тензията, както и в такова състояние съдовете пребиваваха около 100-120 sec, през което време съдовете след бързо и кратко съкращение достигаха стабилно ниво на тензията. Този процес беше повтарян толкова пъти, колкото бе необходимо да се достигне такова разтягане на

съдовете, което да генерира стойност на тензията еквивалентна на 90% от пасивния диаметър и при този диаметър ефективното налягане е 13,3 kPa (100mm Hg) (Mulvany & Halpern, 1977; Hudson et al., 2007). Нормализационната процедура отчита разликите в дължината и диаметъра на сегментите, като по този начин позволява да се изследват различните съдове при идентични условия на вътресъдови налягания, които са много близки до тези в интактни биологични обекти (Shirasawa et al. 2003).

След нормализацията съдовите сегменти се инкубират около 30 min преди същинската експериментална процедура.

Във всеки експеримент се тестваха виталността на препарата и наличието на интактен ендотел. Първото се осъществяваше чрез последователни апликации PSS за преконтрахиране на съдови сегменти в началото на експеримента след нормализационната процедура. Присъствието на функционално интактен ендотел се проверяваше чрез ацетилхолин-предизвикана релаксация (Ach) ($10^{-5}M$), приложен върху платото на 125mM K^{+} - предизвиканото съкращение.

Видовете препарати, обособени в четири групи в зависимост от наличието на интактен ендотел и/или невронална регулация, бяха както следва: 1) нативни (с интактни ендотел и неврони); 2) с отстранен ендотел; 3) с нативен ендотел и тетродотоксин-третираните неврони (периваскуларните неврони бяха с блокирана пропация на акционни потенциали от този инхибитор на Na-каналите); и 4) деендотелизирани и тетродотоксин-третираните препарати.

IV.3. Статистическа обработка на експерименталните резултати.

Получените експериментални данни бяха обработени по метода на вариационния анализ ANOVA. Резултати са представени като средни аритметични стойности, получени от препарати, изолирани от отделни експериментални животни. Изчислявани бяха също стандартната грешка (\pm S.E.M.) на средната аритметична стойност. Статистическата достоверност при сравняване на средните стойности се определяше по Student's test и Tukey-Kramer Multiple Comparison test за чифтни и групови данни при статистическа достоверност $P < 0.05$. При статистическата обработка на данните, построяването на графиките и цялостното оформление на фигурите бяха използвани компютърните програми "GraphPad InStat" v2.04 и v3.02, "Origin Pro 7.5 PRO", "Corel Draw" и "MyoData" v2.02.

IV.4. Разтвори и субстанции

IV.4.1. За изследване на стомашно-чревния тракт

За изследване съкратителната активност на препарати изолирани от стомашно-чревния тракт беше използван модифициран разтвор на Кребс със състав (в mM): NaCl 110, KCl 6.00, NaH₂PO₃ 1.2, NaH₂CO₃ 2.5, KH₂PO₄ 1.19, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, glucose 11.5.

IV.4.2. За изследване на съдове

За изследване съкратителната активност на съдови препарати бяха използвани три разновидности на модифициран разтвор на Кребс с различен състав (в mM):

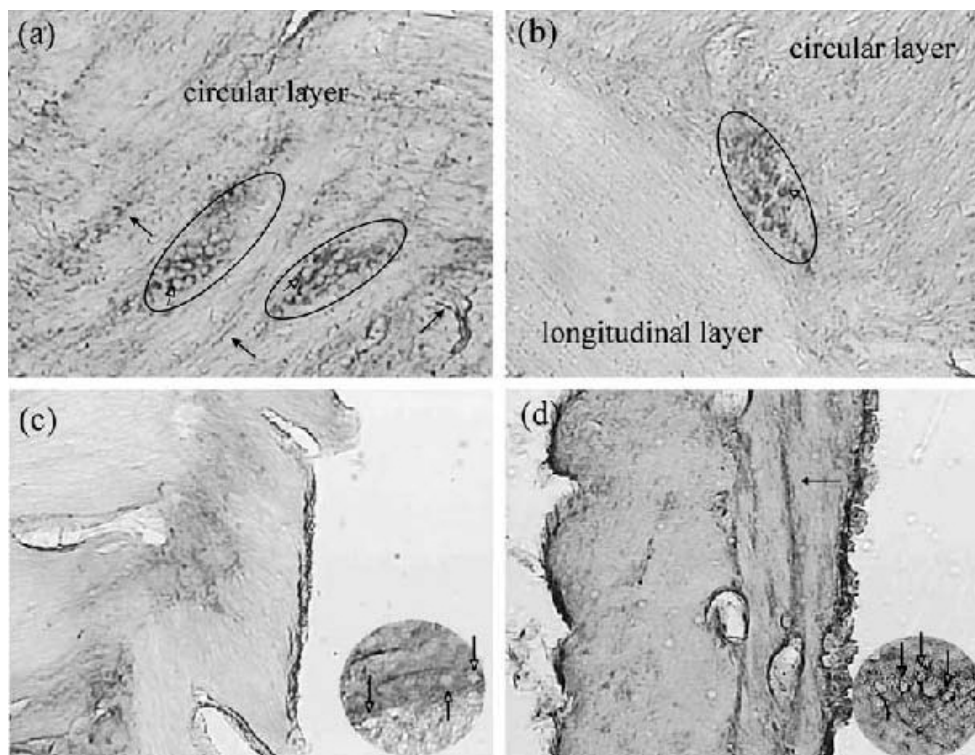
- За изолиране и монтиране на съдови сегменти – NaCl 112.5, KCl 4.75, NaH₂CO₃ 25.00, KH₂PO₄ 1.19, MgSO₄.7H₂O 1.8, CaCl₂ 0.00 или 0.16, glucose 11.5. Липсата на CaCl₂ в разтвора е необходимо за да се осигури отпуснато (дилатирано) състояние на съдовата мускулатура. По този начин се минимизира механичното травмиране на артериалното стена по време на препараторните процедури (Hesselund, 2003)
- За съхраняване на съдови сегменти – NaCl 118, KCl 5, CaCl₂ 2.5, glucose 11.5, Taurine 10, Piruvic acid 5, HEPES 25 (pH 7.4÷7.5).
- PSS за съкратителни изследвания – тези разтвори бяха с различен състав в зависимост от изследваните кръвоносни съдове, както следва:
 - За преконтрахиране на съдови сегменти - KCl 125, MgSO₄.7H₂O 1.8, NaH₂CO₃ 25.00, KH₂PO₄ 1.19, EDTA 0.03, CaCl₂ 2.5, glucose 5.5.
 - За коронарни съдове - NaCl 110, KCl 6, MgSO₄.7H₂O 1.2, NaH₂CO₃ 25.00, KH₂PO₄ 1.19, EDTA 0.03, CaCl₂ 2.5, glucose 5.5.
 - За *a. basilaris* – NaCl 112.5, KCl 3.5, MgSO₄.7H₂O 1.2, NaH₂CO₃ 25.00, KH₂PO₄ 1.19, EDTA 0.03, CaCl₂ 1.5, glucose 5.5.
 - За *a. ophthalmica* - NaCl 112.5, KCl 4.75, MgSO₄.7H₂O 1.2 , NaH₂CO₃ 25.00, KH₂PO₄ 0.19, EDTA 0.03, CaCl₂ 2.5, glucose 5.5.

V. Резултати и обсъждане

V.1. Участие на ендогенния въглероден оксид в реализиране на съкратителен отговор при гладко-мускулни препарати от фундус на стомах.

V.1.1. Имунохистохимично доказване наличието на НО във фундус на стомах.

Беше проведено имунохистохимично локализиране на НО-1 и НО-2 в миентерични ганглии, интермодални направления и в мускулните слоеве.



Фиг. 1. Имунохистохимично оцветяване за наличие на НО-1 и НО-2. Имунохистохимично оцветени 30 μm дебели срезове от стомашен фундус на морско свинче за НО-2 (**a** и **b**) и НО-1 (**c** и **d**). В (**a**) и (**c**) – нетретиран животни. В (**b**) и (**d**) – третираните животни. Кръгове в (**a**) и (**b**) маркира миентерични ганглии. В (**a**) и (**d**) плътните стрелки показват наличието на имунопозитивни варикозности в гладкомускулната стена между маркираните ганглии. Отворените стрелки показват имунореактивни тела на нервните клетки в миентеричните ганглии.

Имунохистохимията извършена с поликлонални антитела-2 за НО, показва ниско, но измеримо присъствие на НО-2 в гладка мускулна тъкан, което се изразява в единно вътреклетъчно разпределение на петна, които не показват разлика между третиран и нетретиран животни (**Фиг. 1a, b**). НО-2 специфично оцветяване е по-силно изразено в зоните, включващи циркуларния слой, в сравнение с лонгитудиналния (**Фиг. 1b**). В третираните животни значими промени бяха наблюдавани при оцветяване за НО-1 между фона и областите, включващи гладкомускулния слой на стената. Имаше също

така значителни промени в интензивността на оцветяване НО-1, между третирани и нетретирани животни (Фиг. 1с, d). Установено бе, че НО-1 се експресира в гладкомускулния слой на стомашния фундус след въвеждането на CoCl_2 . Имунореактивността за НО-2 се наблюдаваше и в телата на нервните клетки на миентеричния сплит (Фиг. 10а, b). С помощта на контрастиране с хематоксилин, отрицателните и имунопозитивните неврони бяха преброени в последователни срезове и беше изчислен относителният дял на имунопозитивните / имунонегативни неврони. Около 35% от невронните тела в миентеричния сплит са НО-2-имунопозитивни. Имунореактивни нервни влакна присъстват в нервните връзки с различни диаметри между мускулните влакна. Имунопозитивни нервни влакна бяха наблюдавани по-често в циркуларния, отколкото в лонгитудиналния мускулен слой. Не имунореактивни невронните тела за НО-1, бяха наблюдавани в миентерични ганглии на двете групи - третирани и нетретирани морски свинчета. Въпреки това, при третирани животни имунопозитивни нервни влакна бяха наблюдавани в нервните пътища (Фиг. 1d) и по нервните връзки, успоредни на мускулните слоеве.

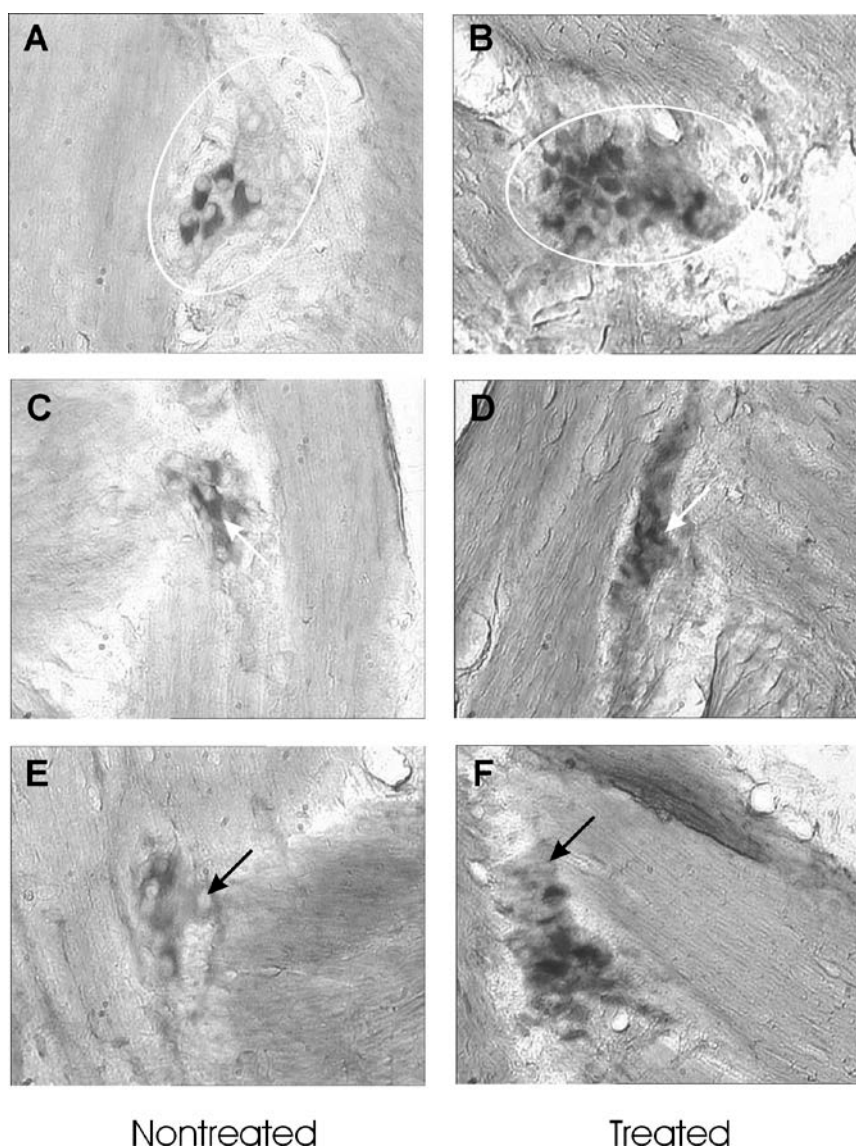
Тези резултати показват, че НО-2 е конституционално присъстваща в миентерични неврони от морски свинчета и НО-1 може да се експресира в невронните елементи инервиращи гладката мускулна тъкан на стомаха, в резултат на *in vivo* индукция с CoCl_2 . От липсата на позитивно оцветяване за НО-1 в клетъчните тела на миентерични неврони може да се предположи, че НО-1 се транспортира от клетъчното тяло по дължината на нервното влакно в посока на ефекторната тъкан незабавно след неговата синтеза. Фактът, че присъствието на НО-2 в невронални клетъчни тела беше по-слабо изразено в третирани с CoCl_2 животни може да се интерпретира в посока, че външни фактори като тежки метали могат да повлияват транспорта на НО по дължината на аксона към крайните проекционни места.

Представените имунохистохимични изследвания показват за първи път присъствие на НО-2 в гладкомускулни клетки и невронални клетъчни тела във фундус на стомах при експериментален модел от морско свинче. Наблюденията за експресия на НО-2 в невронните елементи инервиращи гладката мускулна тъкан на стомаха дават доказателство за функционална индукция на НО-1 в нервните терминали и поставят начало на дебата за ролята на СО в регулиране на съкратителната активност на висцералните гладки мускули.

V.1.2. Хистохимично доказване наличието на NADPH във фундус на стомах.

При нетретирани животни имунохистохимичните изследвания показаха наличие на NADPH-d-положителни неврони (Фиг. 2).

Оцветяването беше в единични неврони от ганглиите на миентеричния плексус. В гладко-мускулната тъкан оцветяването беше слабо. При третирани животни преобладаваща част от невроните в миентеричните ганглии на стомашен фундус бяха NADPH-позитивни, като оцветяването е главно на телата на невроните, а нервните пътища не бяха оцветени. Гладко-мускулните тъкани също бяха интензивно оцветени, което показва наличието на голямо количество NADPH-d в тези тъкани.



Фиг. 2. Хистохимично оцветяване за наличие на NADPH във фундус от стомах на морско свинче. **A, C, E** - оцветяване в срезове от нетретирани с CoCl_2 животни; **B, D, F** - оцветяване в срезове от третирани с CoCl_2 животни. Ясно се различават миентеричните ганглии - оградените области на **A** и **B**; със светли стрелки са означени имунопозитивните неврони (**B** и **C**); с тъмни стрелки са означени имунонегативни неврони (**E** и **F**)

Наличието на позитивни за NADPH-d неврони в тъканите на третирани с CoCl_2 експериментални животни показва, че NOS, както и NO се повлиява от състояния на оксидативен стрес и е дават доказателство за функционална индукция на NOS при този експериментален модел.

Наличието както на имунопозитивни неврони за NO, така и на позитивни за NADPH-d неврони в миентеричните ганглии предполага, че продуктите от ензимната им дейност, съответно ендогенен CO и NO, ще се отделят в идентични структури. Тази колокализация позволява да се спекулира с твърдението, че ендогенният CO и NO взаимодействат във фундус от стомах на морско свинче. Подобно взаимодействие, но при различни обекти е показано в ренални артериоли (Botros a. Navar, 2006), ренални артерии (Stone a. Marletta, 1994; Levonen et al., 2001), където двата газова невротрансмитера могат да активират sGC за да повишат нивата cGMP и предизвикат вазодилатация. Освен това е известно, че ниски нива на CO (0.001 до 0.1 $\mu\text{mol/L}$) могат да стимулират освобождаване на NO, докато високи нива на CO ($\geq 1 \mu\text{mol/L}$) инхибират NOS (Thorup et al., 1999). Също така свръхекспресия на съдово-специфичната NO-1 в гладката мускулатура намалява NO-медирана вазодилатация, и причинява хипертония (Imai et al., 2001).

За наше съжаление няхаме възможност да изследваме използваните от нас обекти едновременно за наличие/отсъствие на индукция на NO и NOS при модел на индуциран с CoCl_2 оксидативен стрес. Такова изследване би осветлило по-добре въпроса за колокализацията на двете ензимни системи в стомашен фундус, както и функционалното взаимодействие между двата газова невротрансмитера.

V.1.3. Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на циркуларни гладкомускулни препарати от фундус на морско свинче – резултати и дискусия.

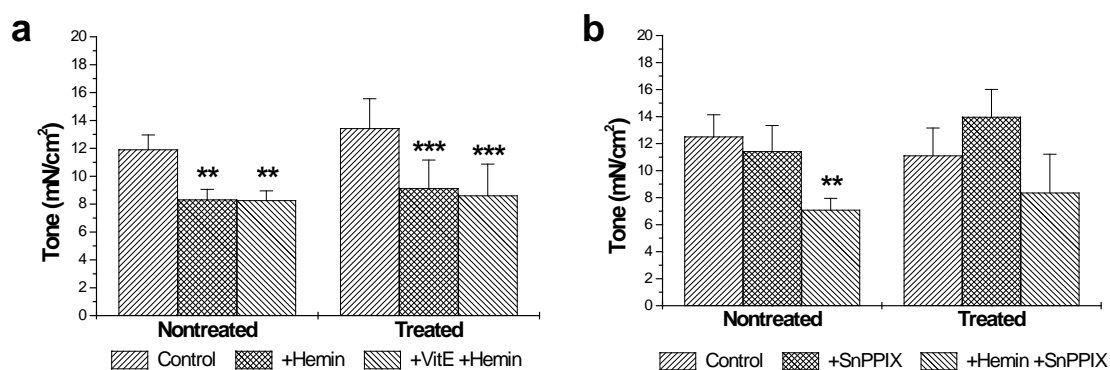
Влиянието на ендогенния въглероден оксид беше изследвано чрез три различни експериментални протокола. При първият беше оценен ефекта на haemin ($10 \mu\text{M.L}^{-1}$) върху спонтанния тонус в присъствието на tetrodotoxin (TTX) ($1 \mu\text{M.L}^{-1}$), прибавен за блокиране освобождаването на невротрансмитерите от интрамуралните неврони. При втория беше изследвано въздействието на haemin и SnPPIX върху Prostaglandin- $\text{F}_2\alpha$ ($\text{PGF}_2\alpha$) предизвикания тонус. В третия протокол на фона на $\text{PGF}_2\alpha$ -индуциран тонус бяха насложени електрически евокирани стимули (EFS). Ефектите от haemin и SnPPIX бяха оценявани по амплитудата на EFS-предизвиканите релаксации за отчитане на

ролята на haemin в невrogenните отговори. В някои от експериментите haemin беше прилаган след Vitamin E добавян в разтвора, който беше използван за неутрализиране на свободни радикали.

Неврогенно-зависимият отговор на фундуса на стомаха на морско свинче се състои от acetylcholine-зависима съкратителна компонента (блокираща се от атропин), както и релаксаторна компонента, която се смята, че зависи от освобождаването на NO (при стимулация с честоти под 10 Hz) и вазоактивния интестинален полипептид VIP (при стимулиране на честоти над 10 Hz). По този начин, при стимулиране с честоти между 1 и 5 Hz, NO е най-вероятно основният релаксаторен невротрансмитер, освободен при EFS в тази тъкан (Sotirov et al. 1999 г.; Sotirov & Papasova 2000 г.). Ето защо беше преценено да се използват две честоти на стимулация в диапазон 1 - 5 Hz, имайки предвид, че като газови молекули подобно на NO, освобождаването на CO, ако има такова, може да се очаква да стане в този честотен обхват, в който CO ще бъде способен да действа като евентуален релаксаторен невротрансмитер.

Ефекти върху спонтанния и PGF2 α -индуцирания тонус.

Haemin не се отрази на спонтанния тонус в присъствието на TTX в двете групи - третирани и нетретирани животни (n=10 за третирани и нетретирани животни). И в двете групи haemin (10 μ M/l), причини статистически значимо намаление на PGF2 α -индуцирания тонус (Фиг. 3а).



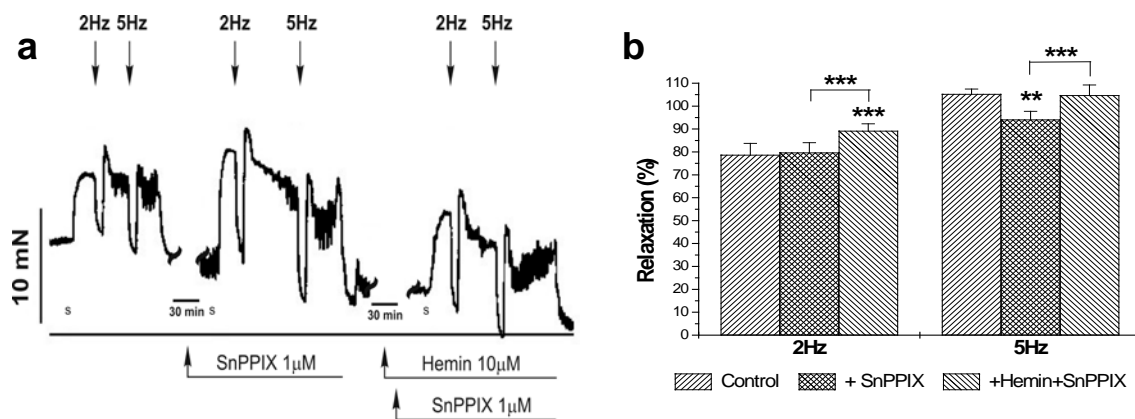
Фиг. 3. Влияние на haemin (10 μ M/l) върху PGF2 α -индуцирания тонус. Отговорите на препаратите са регистрирани в присъствието на атропин (1 μ mol.L⁻¹); (** P <0.01, *** P <0.001).

Наблюдаваното намаление на тонуса след haemin не се повлия в значителна степен от наличието на Vit.E в разтвора (P > 0.05, n=5 третирани и нетретирани животни), или от освобождаването на NO. Това намаляване продължава да съществува дори и в присъствието на 100 μ M L-NNA. И в двете групи, третирани и нетретирани животни,

SnPPIX ($1 \mu\text{M.L}^{-1}$) не показва значително въздействие върху $\text{PGF2}\alpha$ -предизвикания тонус, но се премахва релаксиращото действие на hemin ($n=18$ за нетретирани животни; $n=12$ за третираните животни). Въпреки това, инкубиране на препаратите с hemin 10 минути преди прилагането на SnPPIX все още водеше до намаляване на тонуса, което е статистически значимо при нетретираните, но не и при третираните с CoCl_2 опитни животни (Фиг. 3b). По-висока концентрация на SnPPIX ($30 \mu\text{M.L}^{-1}$) напълно премахва hemin-индуцираното намаляване на тонуса. Несъществени разлики се наблюдаваха в релаксаторното действие на hemin върху $\text{PGF2}\alpha$ -индуцирания тонус между третирани и нетретирани животни ($n=12$ за нетретирани и $n=14$ за третирани с CoCl_2 морски свинчета; $P > 0.05$).

Ефекти върху електрически предизвиканите релаксации.

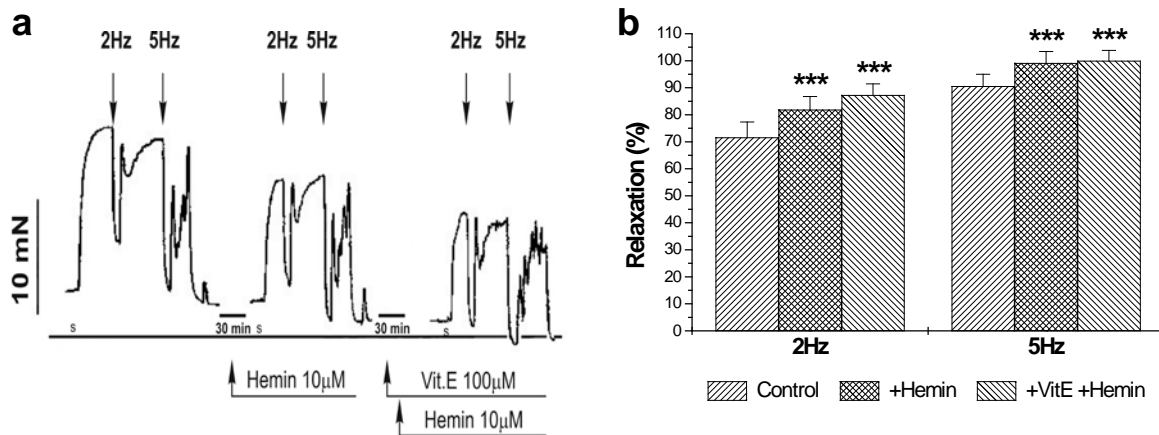
При нетретирани морски свинчета hemin влияе върху електрически предизвиканите релаксации при честоти от 2 и 5 Hz. SnPPIX ($1 \mu\text{M.L}^{-1}$) има значително въздействие само върху EFS-евокирани релаксации при 2Hz стимулиране. Добавянето на SnPPIX 10 минути след прилагането на hemin доведе до значително увеличение на релаксаторния отговор, който е сравним с този при липсата на SnPPIX (Фиг. 4a). При 5 Hz същата концентрация на SnPPIX ($1 \mu\text{M.L}^{-1}$), доведе до статистически значимо намаление на релаксаторния отговор на гладкомускулната тъкан.



Фиг. 4. Ефект на SnPPIX ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) върху EFS-евокираната релаксация на цикларни нишки от стомашен фундус при нетретирани морски свинчета. (a). Оригинален запис: Горизонтална линия - "нулев" тонус, измерен в работен разтвор без Ca^{2+} ; със стрелка е отбелязано добавянето на $\text{PGF2}\alpha$ ($0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) за предизвикване покачване на тонуса. Инкубиране с SnPPIX за 20 min, с hemin - 10 min преди прилагането на SnPPIX. Отговорите на нишките към EFS са регистрирани в присъствието на атропин ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (b) Релаксаторен отговор за 2 Hz ($n=8$) и 5 Hz ($n=8$) стимулация. Данните са средни \pm SEM (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

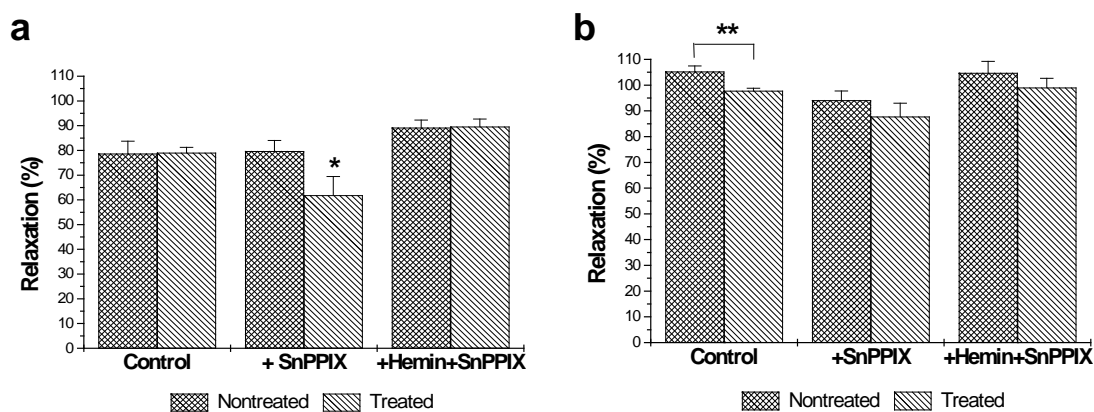
Добавянето на hemin 10 мин преди прилагането на SnPPIX в разтвора, доведе до възстановяване на контролната амплитуда на релаксаторния отговор при EFS (Фиг.4b).

В присъствието на SnPPIX ($1 \mu\text{M.L}^{-1}$), добавен в разтвора 20 минути преди въвеждането на hemin ($10 \mu\text{M.L}^{-1}$) за увеличаване на ефекта от hemin, EFS-вокираните релаксации бяха напълно премахнати и при двете честоти на стимулация.



Фиг. 5. Ефект на hemin ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) върху EFS-евокираната релаксация на цикларни нишки от стомашен фундус при нетретирани морски свинчета. **(a)** Оригинален запис: Хоризонтална линия - "нулев" тонус, измерен в работен разтвор без Ca^{2+} ; със стрелка е отбелязано добавянето на $\text{PGF}_2\alpha$ ($0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) за предизвикване покачване на тонуса. Инкубиране с hemin за 20 min, с Vit. E - 10 min преди прилагането на hemin. Отговорите на нишките към EFS са регистрирани в присъствието на атропин ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$). **(b)** Релаксаторен отговор за 2 Hz (n=12) и 5 Hz (n=12) стимулация. Данните са средни \pm SEM (***) $P < 0.001$.

Hemin, приложен самостоятелно, предизвиква статистически значимо увеличение на релаксаторния отговор и при двете честоти (2 и 5 Hz) EFS-предизвикана стимулация на препаратите (**Фиг. 5a**). Ефектът на hemin не зависи от наличието на Vit E (**Фиг. 5b**).



Фиг. 6. Ефект на SnPPIX ($30 \mu\text{mol.L}^{-1}$) върху ПЕС-предизвикана релаксация при третирани и нетретирани животни. **A** - 2 Hz (n=5); **B** - 5 Hz (n=5). Данните са средни \pm SEM (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

При третирани морски свинчета SnPPIX ($1 \mu\text{M.L}^{-1}$) доведе до статистически значимо намаляване на EFS-предизвиканата релаксация при използваните честоти

(Фиг. 6а). Прилагането на SnPPIX ($1 \mu\text{M.L}^{-1}$) на фона на hemein доведе до възстановяване на амплитудите на релаксаторния отговор на тъканите обратно до контролните им стойности ($n = 8, P < 0.01$ на 2 Hz; $n = 9, P < 0.05$ при 5 Hz).

И при двата протокола на стимулация hemein, когато се прилага самостоятелно или в комбинация с Vit. E, причини увеличаване на EFS-предизвикания релаксаторен отговор, който е статистически значим при 5 Hz стимулация ($n = 12, P < 0.001$) (Фиг. 6б). Не са установени значими разлики в релаксаторния отговор на тъканта при 2 Hz стимулация между третирани и нетретирани животни. Въпреки това, при 5 Hz стимулация на амплитудите на релаксаторните отговори в контрола са значително намалени при третираните животни в сравнение с нетретирани такива (Таблица 1). От друга страна, SnPPIX подтиска релаксаторния отговор на препаратите към EFS много по-ефективно при третираните животни (Таблица 1). Тези данни показват, че активността на НО е по-висока в нервните окончания на третираните животни, но способността на тъканите да релаксират в отговор на NANC стимулация по някакъв начин намалява.

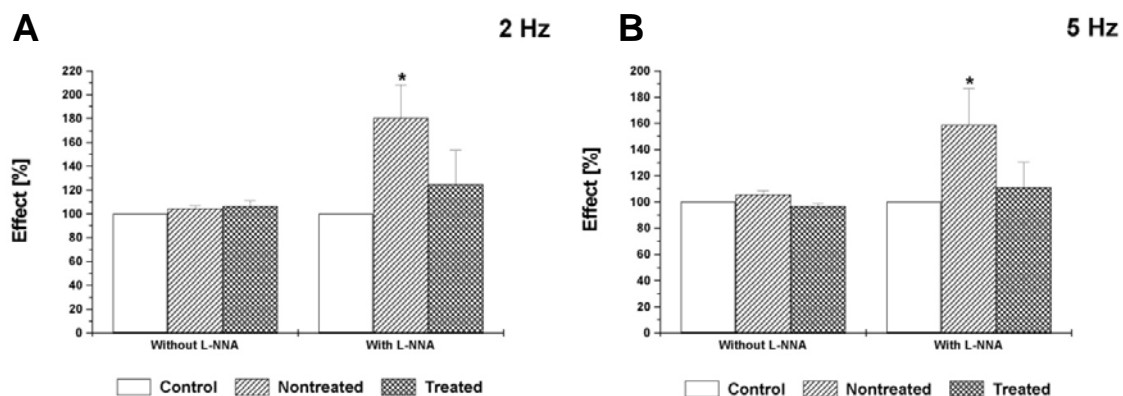
Взаимодействие между СО и NO в стомашен фундус от морско свинче.

Претретирането с $\text{PGF}_2\alpha$ на препаратите от фундус на нетретирани с CoCl_2 животни в присъствието на atropine ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) и L-NNA (0.1mmol.L^{-1}) доведе до повишаване на мускулния тонус. След неговото стабилизиране беше приложена ЕПС с честота 2Hz и 5Hz, всяка с продължителност по 30 сек. След първата стимулация беше изчаквано повторното стабилизиране на мускулния тонус (Фиг. 7а).

Третирането на опитните животни с CoCl_2 не оказва влияние върху спонтанната съкратителна активност и тонуса на препаратите. При повишаването на тонуса на препаратите в присъствие на atropine ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) и L-NNA ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) преди електрическа стимулация се отчита по-дълго време, необходимо за стабилизиране на тонуса след $\text{PgF}_2\alpha$, нестабилност, както и промяна на конфигурацията на релаксаторния отговор (Фиг. 7б). След относителното стабилизиране на мускулния тонус беше приложена EFS с честота 2Hz и 5Hz, всяка с продължителност по 30s. След края на първата стимулация беше изчаквано повторното стабилизиране на мускулния тонус.

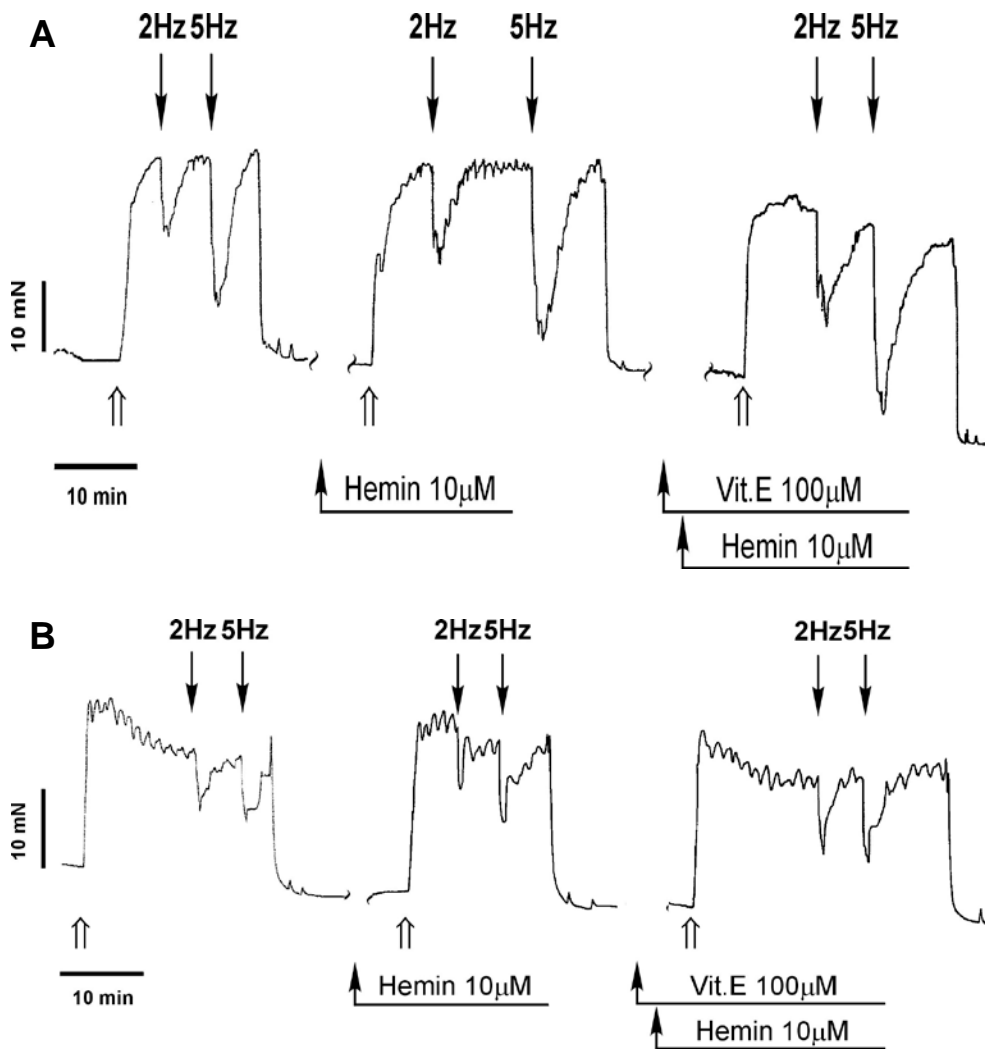
При нетретирани животни блокирането на NOS доведе до увеличаване със 76% на ефекта на Hemein върху EFS-предизвикания отговор при честота на стимулация 2Hz (Фиг. 7). При третираните с CoCl_2 животни hemein има ефект върху релаксаторния

отговор само при ниската честота на стимулация – 2Hz, като блокирането на NOS увеличава неговия ефект с 18%.

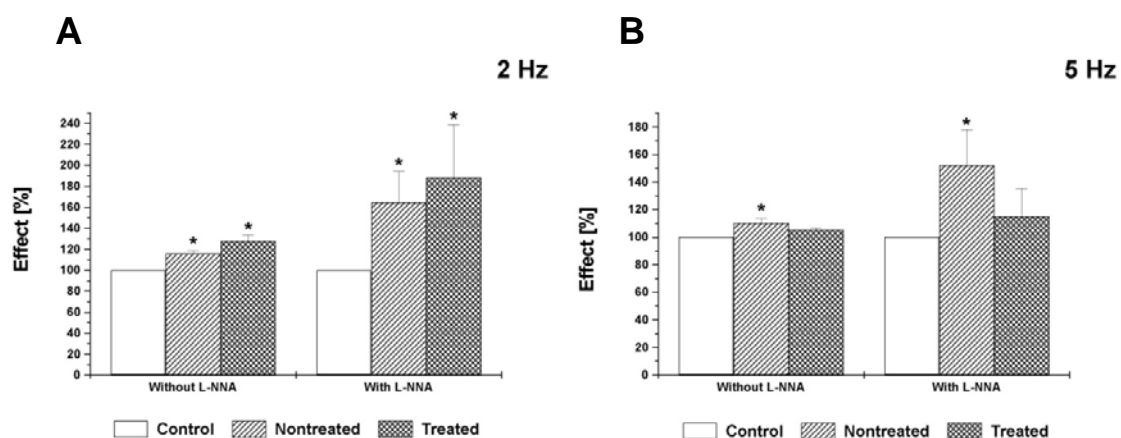


Фиг. 7. Ефект на Nemin (10 μmol.L⁻¹) върху ЕПС-предизвикана релаксация при третиранни и нетретиранни животни в отсъствие и присъствие на L-NNA. **A** - 2 Hz (n=5); **B** - 5 Hz (n=5). Данните са средни ± SEM (* p<0.05).

При нетретираните животни наличието на VitE в разтвора редуцира ефекта на Nemin до 49%. При 5Hz увеличението на ефекта на Nemin е с 51%, а наличието на VitE го редуцира до 41%. Наличието на VitE в разтвора при третираните с CoCl₂ животни, обаче, повишава ефектът на Nemin до 61%.



Фиг. 8. Оригинални експериментални записи показващи ефекта на hemin ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) върху ЕПС-предизвиканата релаксация при ГМП от фундус на нетретирани **(A)** и третирани **(B)** морски свинчета. Със стрелка е отбелязано добавянето на $\text{PGF}_2\alpha$ ($0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) за предизвикване покачване на тонуса. Инкубиране с hemin за 20 min, с Vit. E - 10 min преди прилагането на hemin. Отговорите на нишките към EFS са регистрирани в присъствието на атропин ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$).



Фиг. 9. Ефект на Hemin (10 $\mu\text{mol.L-1}$) върху ЕПС-предизвикана релаксация при третиран и нетретиран животни в присъствие на VitE (100 $\mu\text{mol.L-1}$). **A** - 2 Hz (n=5); **B** - 5 Hz (n=5). Данните представят средно аритметично \pm SEM (* $p < 0.05$).

Блокирането на NOS води до премахване ефекта на SnPPIX (Таблица 1). Претретирането с hemin преди SnPPIX увеличава амплитудата на релаксаторния отговор. При 5Hz блокирането на NOS не оказва съществено влияние върху ефекта на SnPPIX. От друга страна блокирането на NOS води до намаляване ефекта на SnPPIX с 23% (± 7) (Таблица 1). Наличието на Hemin води до намаляване с 34% ефекта на SnPPIX. При високата честота на стимулация (5 Hz) блокирането не оказва съществено влияние върху ефекта на SnPPIX.

	Effect (%)			
	Nontreated animals		Treated animals	
	2Hz	5Hz	2Hz	5Hz
SnPPIX	*85.36 (± 9.42)	95.52 (± 5.15)	99.61 (± 16.23)	105.08 (± 10.41)
Hemin + SnPPIX	91.19 (± 11.9)	*110.25 (± 2.73)	*134.63 (± 20.05)	107.68 (± 16.16)

Таблица 1. Ефект на SnPPIX (1 $\mu\text{mol.L-1}$) сам и в присъствие на hemin (10 $\mu\text{mol.L-1}$) върху ПЕС-предизвиканата релаксация при нетретиран (n=5) и третиран (n=5) морски свинчета; (* $p < 0.05$ vs control).

През 1999г. Foresti a. Moterlini предложиха схема за взаимодействие между двете ензимни системи (CO/HO и NO/NOS) за регулация на индукцията и активността на HO-1 от NOS и NO. В нашите изследвания въздействието, което отделеният при

електрическа стимулация NO оказва, не може да се обясни с въздействие върху експресията на NO-1. От друга страна този ефект е различен при нетретираните животни, т.е. повлиява се и конститутивната изоформа на ензима – NO-2. Също така, блокирането на NOS при третираните животни не довежда до съществени разлики в ефекта на hemin, респективно на ендогенния CO, върху релаксацията на изолирани препарати. Това косвено показва намалено ниво на NOS при третираните животни, което подсказва възможността въздействието с тежки метали да оказва негативно влияние върху експресията на NOS и съответно върху NO-медираната релаксация при електрическа стимулация.

По-нови данни от Lim et al. (2004) показват, че екзогенен CO може да повлияе нормални и туморно експресирани L-тип Ca-канални по пътя на активиране на NOS, повишаване нивата на NO и cGMP, но не и на PKG. Индуцираното от CO отделяне на NO може да обясни забележимото несъответствие между ниският афинитет на гуанилил циклазата за CO и силното отделяне на cGMP, повлияно от CO.

Експерименталните програми за отчитане на релаксиращо действие на hemin на фона на Pgf2 α -предизвикан тонус показват, че освобождаването на CO по време на действие на NO е ефективно премахнато /отстранено/ при претретиране с SnPPIX. Може да се предположи, че източника на CO който причинява релаксацията е невронална NO, тъй като hemin (респективно ендогенния CO) не успява да въздейства спонтанния тонус на изолираните препарати в присъствие на TTX, блокер на невроналното предаване. Резултатите, получени от прилагане на електрическа полева стимулация също предполагат, че CO с невронален произход може да бъде съществен модулатор на съкратителната активност на фундус от стомах на морско свинче. Изглежда, че CO, продуциран в резултат на действието на NO в гладкомускулната тъкан, не е в състояние да въздейства на съкратителната активност в нетретиран морски свинчета. Данните от настоящите изследвания дават убедителни доказателства, че CO продуциран в невроналните елементи обслужващи гладките мускули на стомах упражнява съществена роля в модулиране на съкратителния отговор спрямо конвенционални невромедиатори. Може да се предположи, че CO се освобождава от синапсите и при различни честоти на стимулация. Основание за подобна преценка дава наблюдението, че hemin подобрява релаксаторния отговор на препаратите предизвикан от електрическа стимулация прилагана с честота 2 и 5 Hz.

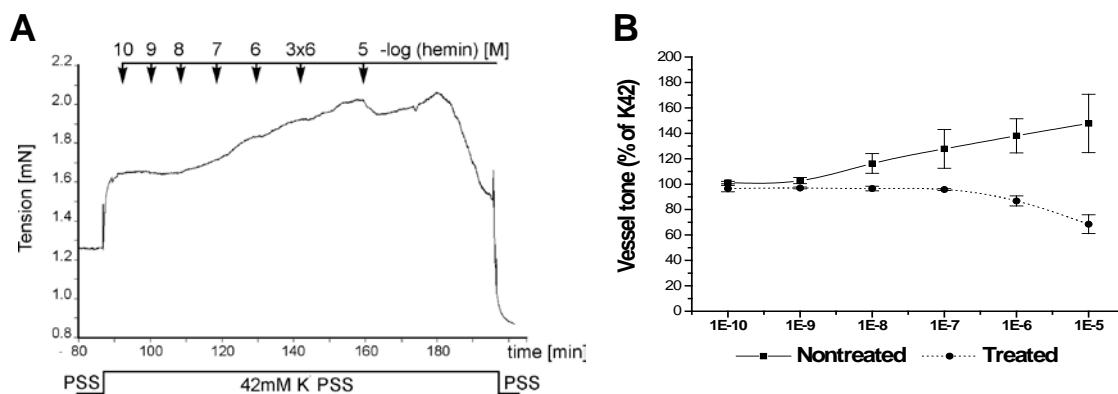
Следва да се отбележи факта, че се наблюдават различия в релаксаторните отговори предизвикани от електрическа стимулация при третирани и нетретирани животни. Налице е разлика в ефектите на калаен протопорфирин в зависимост от прилаганата концентрация и честотата на електрическата стимулация. SnPPIX в концентрация 1 $\mu\text{M/l}$ оказва по-отчетливо действие в антагонизиране на релаксиращия ефект на хемин при стимулация приложена с честота 5 Hz при третираните в сравнение с нетретираните морски свинчета. От тези резултати е възможно да се приеме, че в третираните животни, при прилагане на електрическа стимулация, NO се транспортира значително по ефективно по дължината на нервните терминали към ефекторните тъкани. В съгласие с предложеното становище са и резултатите, че сама по себе си електрическата стимулация подобрява дезинхибицията на невроналния NO от SnPPIX. В унисон на представените собствени наблюдения са данни на Chakder et al. (2000) показващи, че електрическа полева стимулация причинява увеличаване на активността на NO в нервните терминали на вътрешен анален сфинктер.

Обобщено, от изследванията проследяващи ролята на NO в съкратителната активност, както и от имунохистохимичните наблюдения може да се приеме, че външни въздействия (с тежки метали) и електрическа стимулация могат да съучастват в подобро транспортиране на NO-1 и NO-2 от мястото на синтезата им в посока на ефекторните клетки.

V.2. Участие на ендогенния въглероден оксид в реализиране на съкратителния отговор при съдови гладко-мускулни препарати

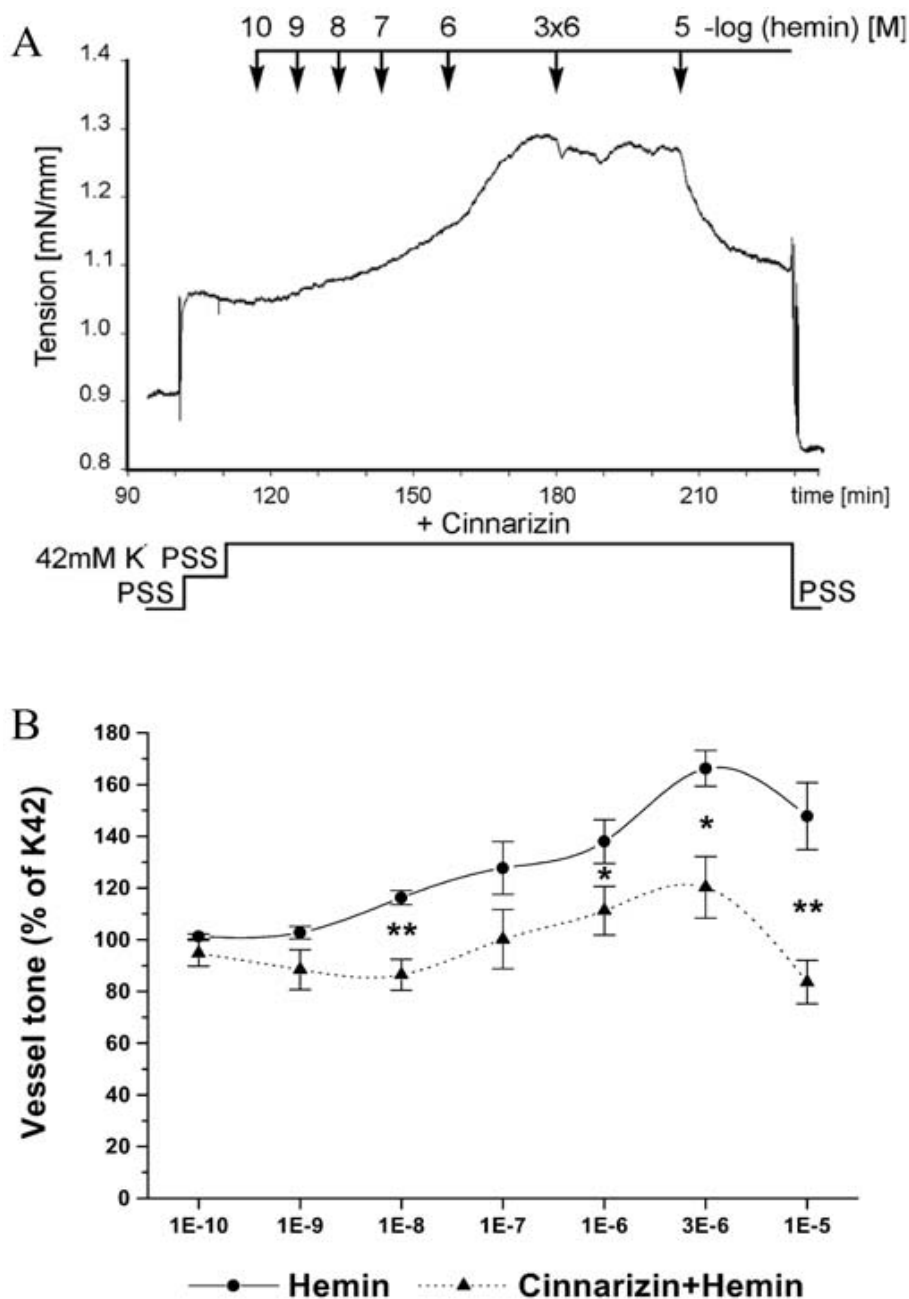
V.2.1. Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на съдови препарати от *a. coronaris* на морско свинче – резултати и дискусия.

Функционалните експерименти върху тонуса на коронарната артерия, измерен в изометричен режим върху деендотелизирани артерии, показаха двуфазно зависим от концентрацията отговор на въздействие с hemin (Фиг. 10). Ниски концентрации на hemin предизвикаха невронално-зависима контракция, докато по-високи концентрации причиняват невронална и ендотелно-независима релаксация на коронарните препарати.



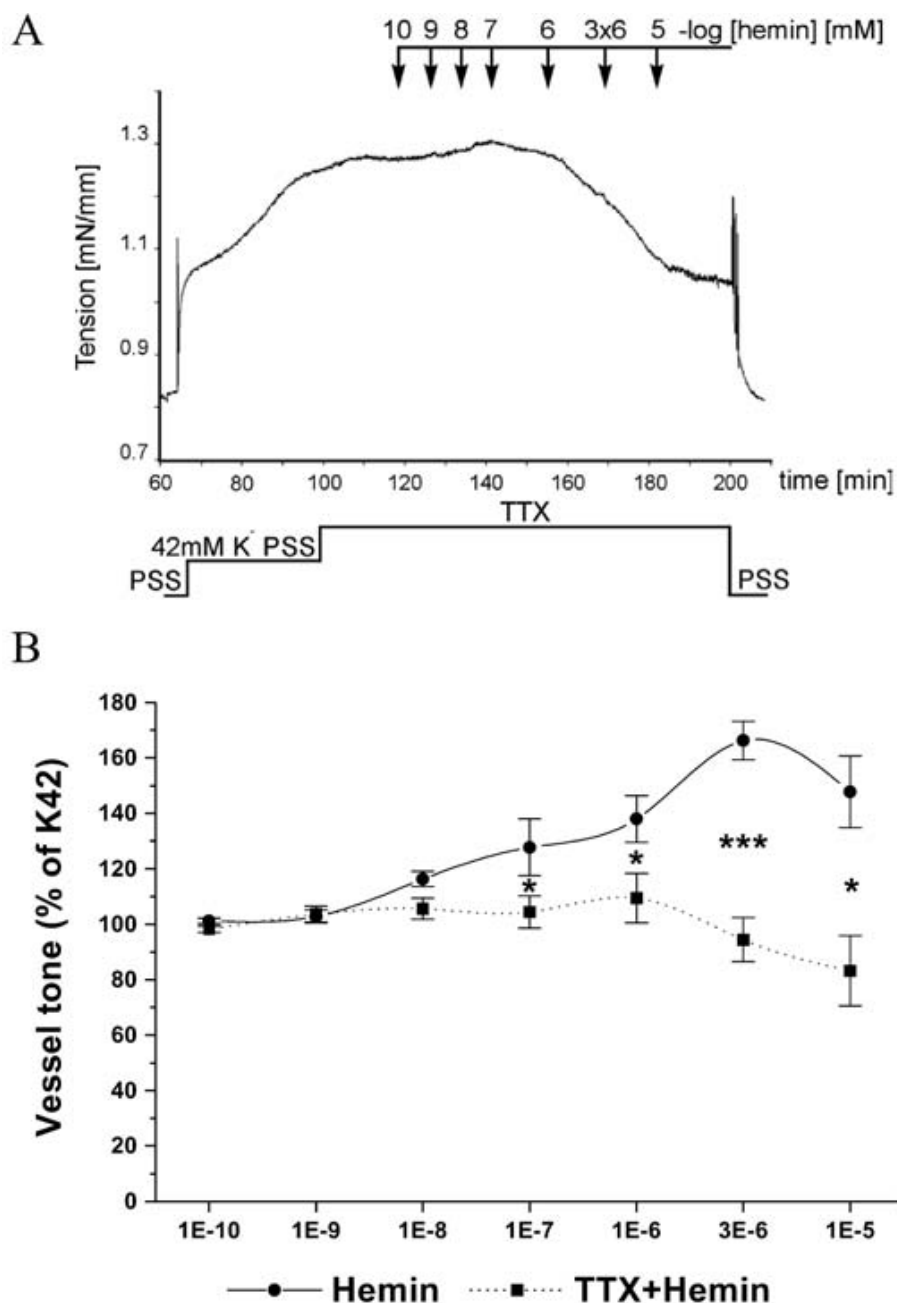
Фиг. 10. Ефект на hemin в нарастващи концентрации (1×10^{-10} - 5×10^{-5} M) върху повишения с 42mM K^+ тонус на сегмент от коронарна артерия на морско свинче. **A** – оригинален запис; **B** – Статистически данни за съкратителни отговор при третиран и нетретиран експериментални животни. Данните представят средно аритметично \pm SEM.

При наличие на екстрацелуларни антиоксиданти (SOD, каталаза, Vit C и Vit E), hemin доза-зависимо увеличава високия K^+ -индуциран тонус на коронарните артерии в концентрационния диапазон между 1 nM и 1 μM . По-високи концентрации (10 μM) индуцират релаксация на препаратите. Cinnarizin, известен като блокер на съдови L- и T-тип voltage-чувствителни Ca^{2+} канали (Petkov GV, 2001), води до намаляване на съдовия тонус в присъствието на hemin, като разликата е статистически значима при 10 μM hemin (Фиг. 11). Фазата на увеличението на тонуса беше намалена след блокиране на voltage-зависимия Ca^{2+} входящ ток (Фиг. 11) и напълно премахната с TTX (Фиг. 12), а релаксаторната фаза изглежда е независима от voltage- чувствителния Ca^{2+} входящ ток.



Фиг. 11. Ефект на hemin в нарастващи концентрации (1×10^{-10} - 5×10^{-5} M) в присъствието на cinnarizin (1×10^{-10}) върху повишения с 42mM K⁺ тонус на сегмент от коронарна артерия на морско свинче. А– оригинален запис; В - статистически данни за съкратителни отговор при третиран и нетретиран експериментални животни. Данните представят средно аритметично \pm SEM.

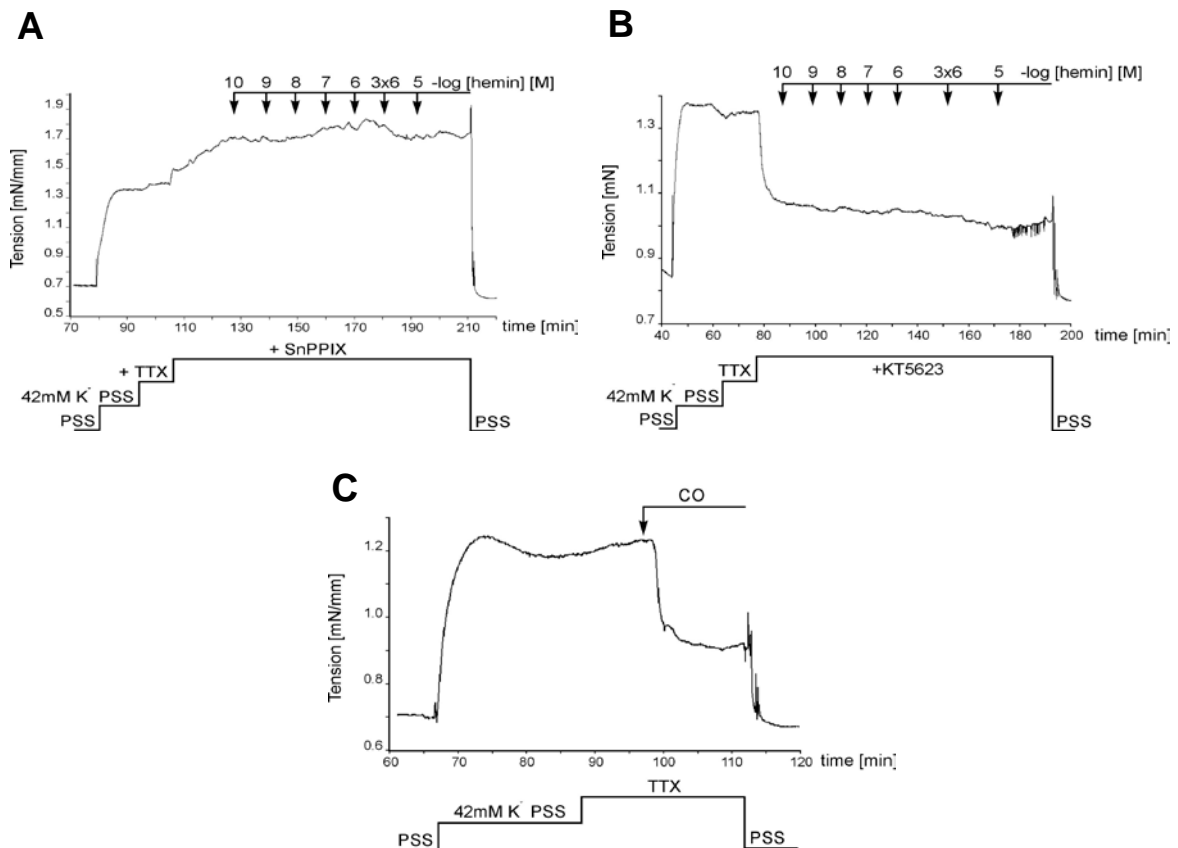
В присъствието на ТТХ, повишаването концентрацията на hemin доведе до релаксация, която е значително по-различна от тази, причинени от hemin приложен самостоятелно в концентрации от 3-10 μ M. Не се наблюдава увеличаване на тонуса в присъствието на ТТХ (Фиг. 21).



Фиг. 12. Ефект на hemin в нарастващи концентрации (1×10^{-10} - 5×10^{-5} M) в присъствието на TTX (1×10^{-10} M) върху повишения с 42mM K⁺ тонус на сегмент от коронарна артерия на морско свинче. **A**– оригинален запис; **B** - статистически данни за съкратителни отговор при третирани и нетретирани експериментални животни. Данните са средни \pm SEM.

При липса на антиоксиданти ефектът на hemin не се промени значително, което предполага, че неговото въздействие не може да се дължи на про-оксидантно действие на Fe²⁺ освободено по време на реакцията на HO. Biliverdin, прилаган на препарати в концентрации между 10 nM и 1 mM, също не повлия, предизвикания от висок K⁺ тонус на съдовете. Релаксаторният и контрактилният ефекти на hemin ефективно бяха неутрализирани както от SnPPIX (30 M), приложен в разтвора 20 минути преди hemin (**Фиг. 13A**), така и от

селективния антагонист на cGMP-зависимата протеин киназа, KT5823 в микромолярни концентрации (Фиг. 13В).

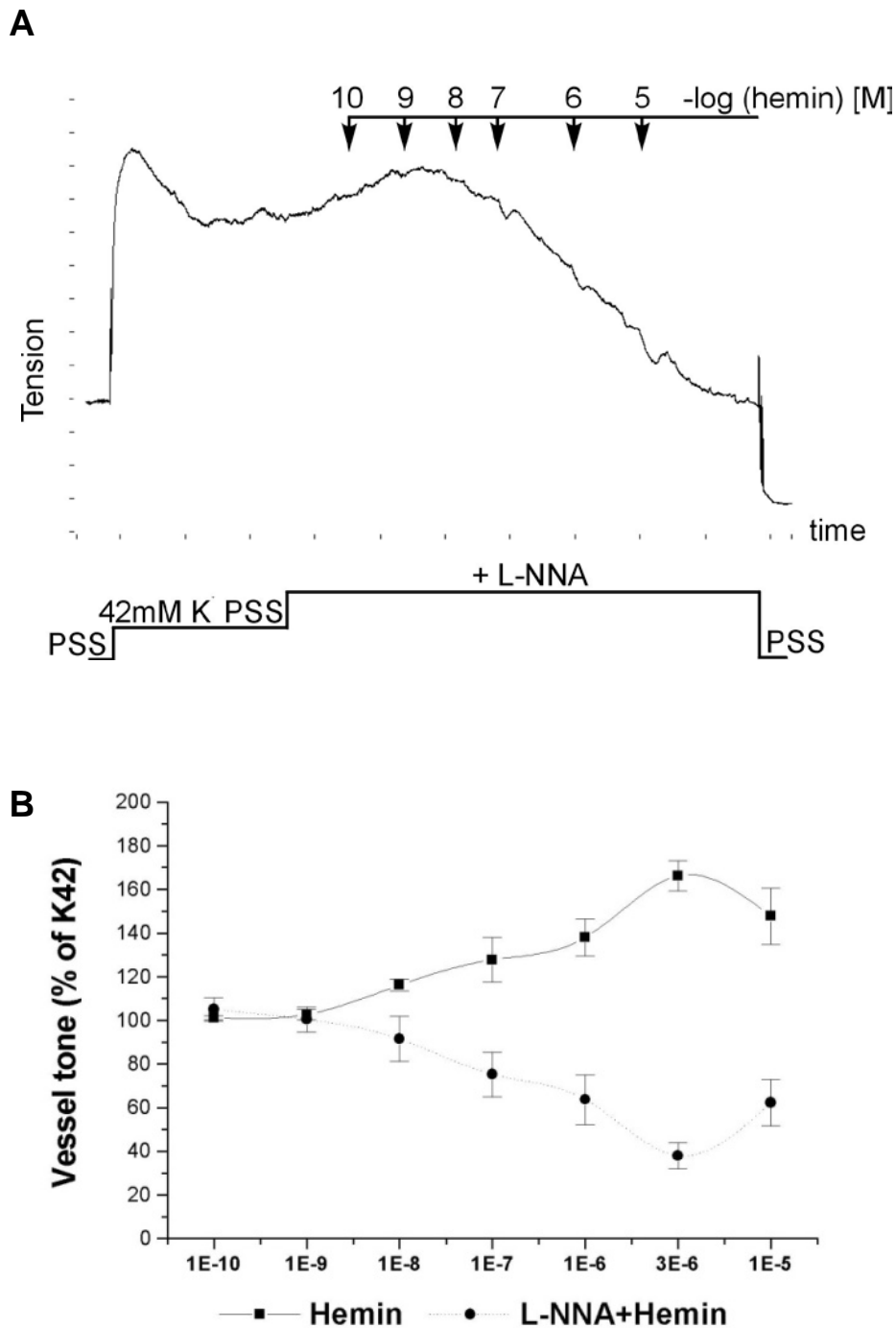


Фиг. 13. Оригинални записи, показващи концентрация-зависим ефект на hemin на преконтрахирани с високо-K⁺ коронарните артерии от морско свинче в присъствието на Sn-протопорфирин IX (SnPPIX, 30 μ M) (A) или населективен блокер на протеин киназа KT5823 (1 μ M) (B). Релаксаторният ефект на езогенен CO върху висок K⁺-евокиран тонус при коронарна артерия е показан в (C). CO беше приложен чрез аериране на работния разтвор. Във всички експерименти 1 μ M TTX е добавян преди другите субстанции, за да се предотврати освобождаването на невротрансмитери.

Присъствието на cinnarizin в ТТХ-съдържащите разтвори също така не повлия нито тонуса, нито амплитудата на hemein-предизвиканата релаксация.

Проведените експерименти с конкурентния инхибитор на NO - Sn-protoporphyrin IX (SnPPIX) показаха, че съкратителното действие на hemein в концентрация 1nM - 1µM върху 42 mM K⁺ PSS преконтрахиранни сегменти е следствие от освобождаването на CO по време на NO-реакция, тъй като тя е ефективно премахната при претретиране с SnPPIX. В концентрация 10 µM hemein предизвиква значителна релаксация на съда, която също бе блокирана от SnPPIX. Съкратителното действие на hemein е установено, че е tetrodotoxin (ТТХ)-чувствително, а релаксаторното действие - ТТХ-независимо.

В присъствието на L-ω-nitro-L-arginine (L-NNA, антагонист на NO-синтазата) артериалният отговор на hemein е релаксация, най-добре изразена в диапазона 10 pM - 1µM на използваните концентрации (**Фиг. 14**). Възможното взаимодействие между продуктите от NO и NO-синтаза се обсъжда на невронално и гладкомускулно на ниво.



Фиг. 14. Ефект на hemin в нарастващи концентрации (1×10^{-10} - 5×10^{-5} M) в присъствието на L-NNA (1×10^{-6} M) върху повишения с 42mM K^+ тонус на сегмент от коронарна артерия на морско свинче. А– оригинален запис; В - статистически данни за съкратителни отговор при третирани и нетретирани експериментални животни. Данните представят средно аритметично \pm SEM.

CO, приложен директно чрез аериране на хранителния разтвор, предизвиква само релаксация на съдовите сегменти, което надхвърля 50% от K^+ -индуцирания тонус. Следователно, това подсказва, че hemin-евокираните промени в тонуса на сегментите

от коронарна артерия при нашите експериментални условия, са причинени от CO, освободен по време на NO-катализирана реакция чрез GC/cGMP-зависим път.

Има основание да се приеме, че наблюдаваното повишение на тонуса в присъствието на hemin е най-вече зависимо от някои невронални агенти, докато релаксацията е с гладко-мускулен произход. Като се има предвид, че по абсолютна стойност контролният тонус, предизвикан от разтвора с висок K^+ не се промени значително от наличието на cinnarizin, изглежда, че разликите в ефекта на hemin между контролните и третирани с cinnarizin препарати са също в резултат от някои невронално-зависими ефекти на този Ca^{2+} блокер. Последното предположение е допълнително подкрепено от наблюдението, че присъствието на cinnarizin в ТТХ-съдържащите разтвори не повлия нито тонуса, нито амплитудата на hemin-предизвиканата релаксация. По този начин може да се предположи, че CO получен от гладката мускулатура действа както на невронните елементи, така и на гладката мускулна тъкан на коронарните артерии. Ето защо, ако невроналното отделяне на невротрансмитери е блокирано с ТТХ, ефектът от CO върху гладката мускулатура е релаксация. Получените резултати подреждат предположението, че експресията на конститутивната NO-2 в коронарните артерии гладкомускулни клетки играе роля в моделиране тонуса на коронарна артерия.

Проследяването на тонуса на коронарна артерия показва двуфазен, концентрация-зависим отговор при въздействие с hemin. Фазата на повишаване на тонуса се потиска след блокиране на волтаж-зависимото навлизане на калций и напълно се премахва при въздействие с ТТХ. Фазата на релаксация е независима от потока на Ca^{2+} . Това са убедителни доказателства, че увеличаването на тонуса може да се определи като зависимо от невронално отделена субстанция, докато релаксацията е с гладко-мускулен произход. В този аспект, може да се предположи, че разликата в ефектите на хемин при контролни и cinnarizin-претретирани препарати е също резултат от невронално-зависим ефект на използвания блокер на навлизане на калций.

Експериментите с SnPPIX, конкурентен инхибитор на NO показват, че съкратителното, концентрация-зависимо действие на hemin върху преконтрахираните сегмент-препарати може да се отдаде на освобождаване на CO по време на хемоксигеназна реакция, тъй като е налице ефективно премахване при претретиране с калаен протопорфирин. Двуфазният ефект на hemin върху препарати от коронарна артерия, невронално-зависимо повишаване на тонуса и невронално-независима

релаксация се доказват при третиране на препаратите с блокера на невроналното провеждане ТТХ. ТТХ повлиява контрактилното действие и не повлиява релаксаторното действие на hemin.

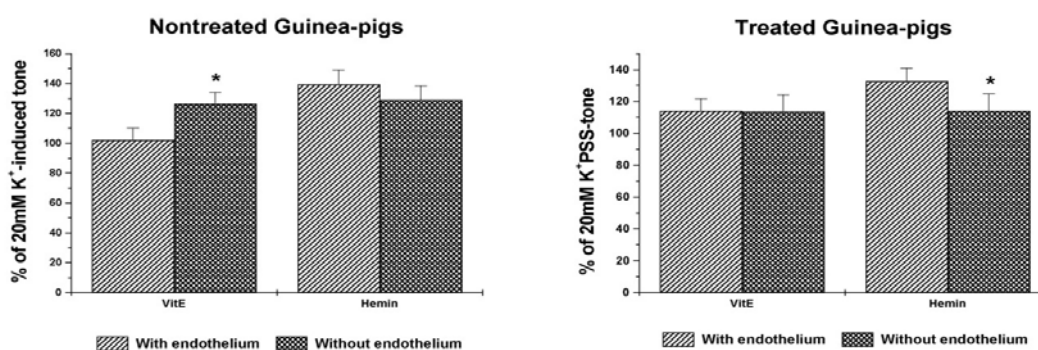
Наблюдението за предизвикан от hemin релаксаторен артериален отговор в присъствие на антагонист на NOS подсказва възможно взаимодействие между регулаторни механизми на NO и NOS на невронално и гладкомускулно ниво.

V.2.2. Влияние на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на съдови препарати от *a. basilaris* на морско свинче – резултати и дискусия.

След периода на адаптиране, препаратите от базиларната артерия проявявиха спонтанна тонична активност. Преконтрахирането с 20mM калиев разтвор доведе до повишаване и стабилизиране на тонуса. Допълнително в разтвора еднократно беше добавян Vit E с цел неутрализиране на свободни радикали.

При контролните животни претретирането на препаратите с Vit E в концентрация 100µM доведе до намаляване на съдовия тонус. Отстраняването на ендотела повиши достоверно съдовия тонус.

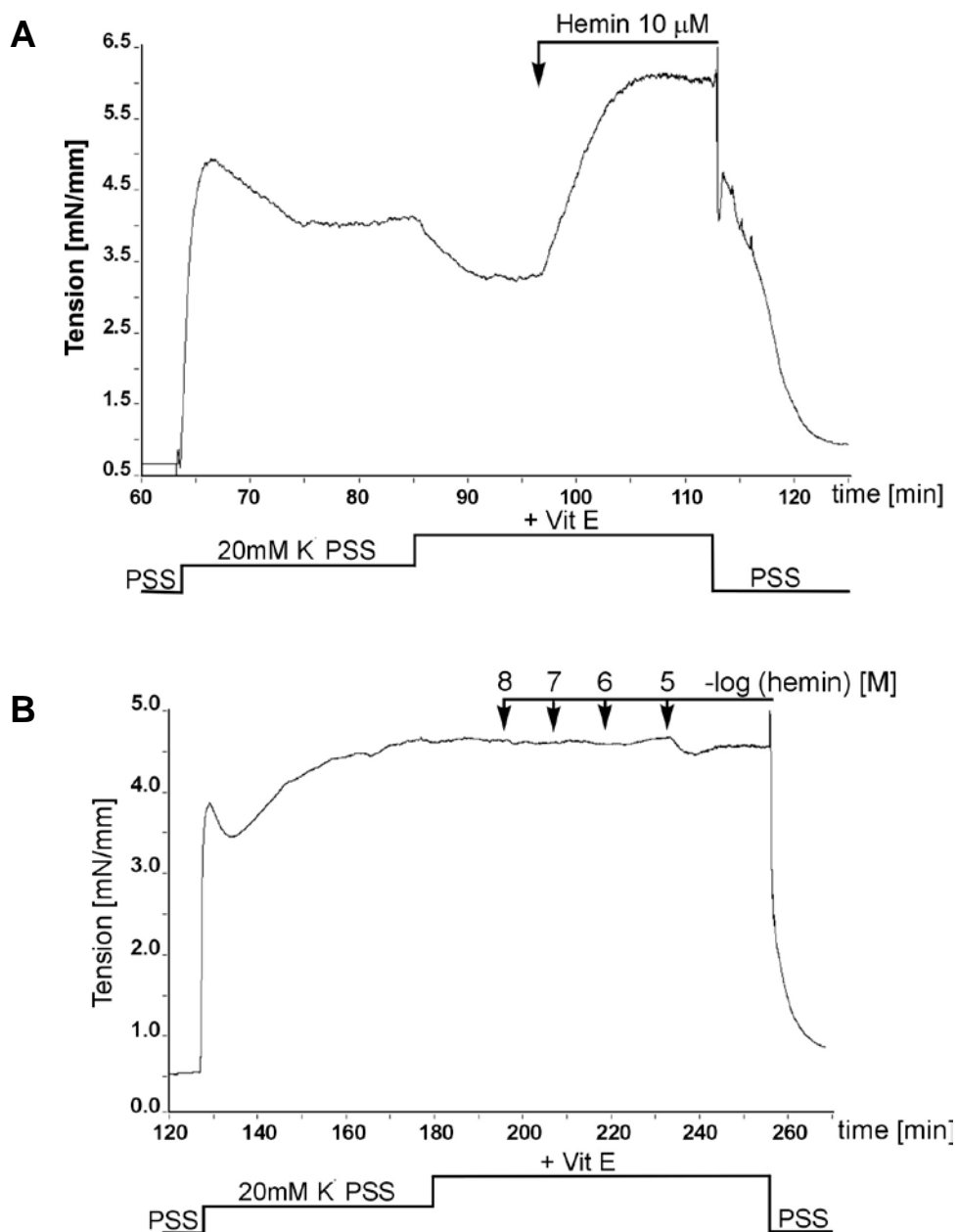
Субстратът на NO – hemin, приложен на фона на претретиране с Vit E предизвиква съкратителен отговор както при интактните препарати, така и при тези с отстранен ендотел. В ниските приложени концентрации hemin няма съществен ефект върху изследваните препарати (Фиг. 15). В концентрациите от 100 nM – 10 µM hemin предизвиква понижаване на тонуса, най-добре изразено в най-високата приложена концентрация.



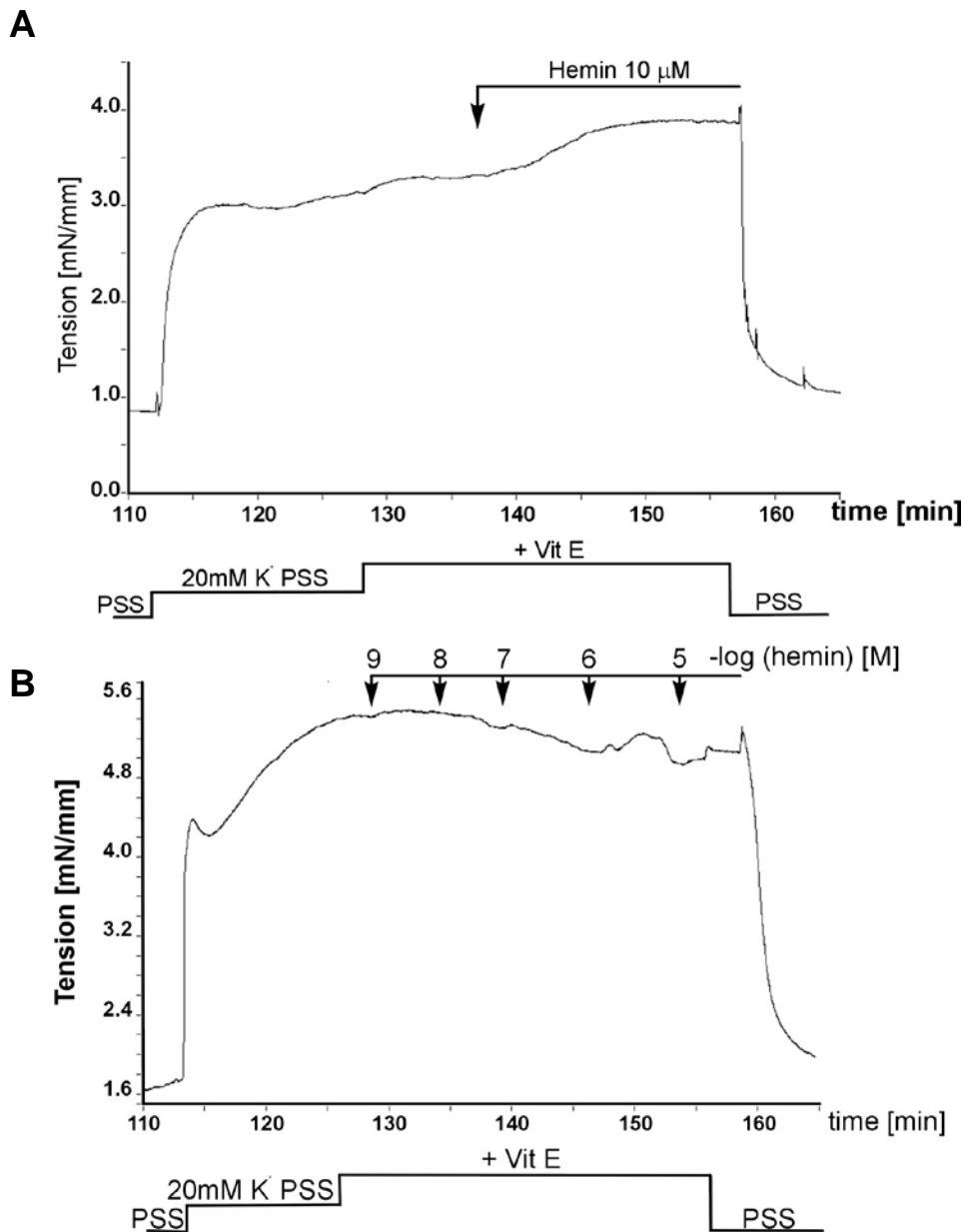
Фиг. 15. Влияние на $CoCl_2$ върху съкратителната активност на базиларна артерия от морско свинче. Данните представят средно аритметично \pm SEM (* $p < 0.05$, $n = 4$)

Отстраняването на ендотела не предизвика съществена промяна в съкратителния отговор, но доведе до намаляване на тонуса с 10% в сравнение с тонуса при интактните препарати (Фиг. 15).

При животните третирани с CoCl_2 отстраняването на ендотела не предизвика промяна в базалния тонус при претретиране с VitE.



Фиг. 16. Оригинални записи, показващи ефект на ендогенния CO при контролни животни – оригинални записи. **A** – еднократно въздействие с hemin (10 μM); **B** – приложение на hemin в нарастващи концентрации (1×10^{-8} - 1×10^{-5} M). Експериментите са проведени в присъствие на Vit E (100 μM).



Фиг. 17. Оригинални записи, показващи ефект на ендогенния CO при третиране с CoCl_2 животни – оригинални записи. **A** – еднократно въздействие с hemin (10 μ M); **B** – приложение на hemin в нарастващи концентрации (1×10^{-8} - 1×10^{-5} M). Експериментите са проведени в присъствие на Vit E (100 μ M).

Hemin, приложен на фона на претретиране с Vit E, предизвика повишаване на тонуса (**Фиг. 17**). Отстраняването на ендотела доведе до намаляване на тонуса с 18% в сравнение с този при съдовете с интактен ендотел.

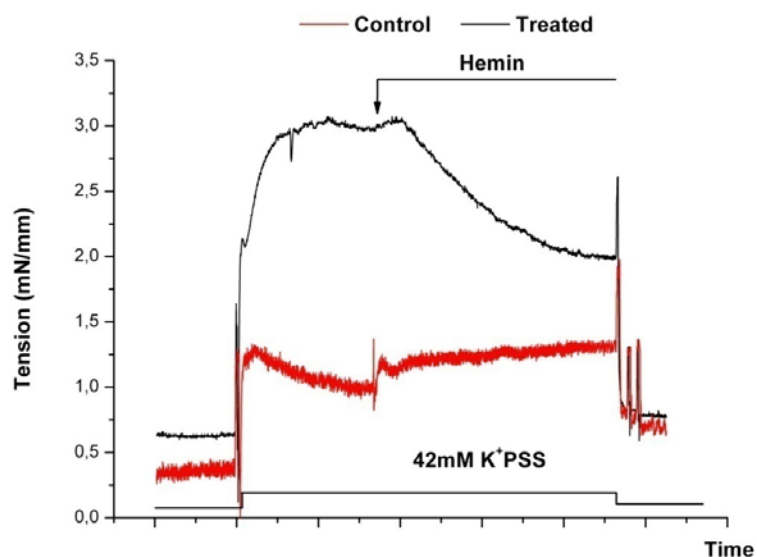
За разлика от еднократното въздействие с hemin, кумулативното натоварване на съдовете както на контролните, така и на третираните с CoCl_2 животни в концентрации от 1nM - 10 μ M оказва противоположен ефект (**Фиг. 17**).

При съдовете на животните с предизвикан оксидативен стрес и интактен ендотел няма промяна в тонуса. Единствено при най-високата приложена концентрация 10 μ M hemin предизвиква незначително намаляване на тонуса.

Резултатите, получени от експериментите за изследване влиянието на ендогенния CO върху *a. basilaris*, показват противоположен ефект на ендогенния въглероден оксид в сравнение с досега известните в литературата. Възможно обяснение е показаното от някои автори (Thorup et al., 1999), където основна роля за CO в бъбречните съдове е да се осигури защита срещу прекомерната вазоконстрикция, когато бъбречната система NO е дефицитна. Обратно, свръхекспресия на съдово-специфичната NO-1 в гладката мускулатура, което води до 3-кратно повишаване на съдовата NO активност, намалява производството cGMP в отговор на NO, намалява NO-медирана вазодилатация, и причинява хипертония (Imai et al., 2001). В базална артерия е налице влияние на съдовия ендотел, особено при наличие на оксидативен стрес, като вероятно под въздействието на ендогенния въглероден оксид от него се отделят вещества, модулиращи съдовия тонус. Също така остава неизяснен въпроса за механизма на повлияване на съдовия тонус – дали е на невrogenно, миогенно ниво или е чрез модулиране освобождаването на трансмитери.

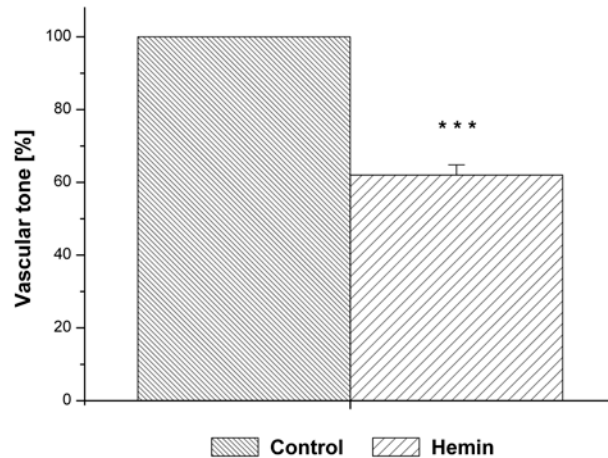
V.2.3. Влияние на въглероден оксид върху съкратителната активност на съдови препарати от *a. ophthalmica* на плъх – резултати и обсъждане.

След периода на адаптиране, сегментите от *a. ophthalmica* проявявиха спонтанна тонична активност. Преконтрахирането с 42mM калиев разтвор доведе до повишаване и стабилизиране на тонуса.



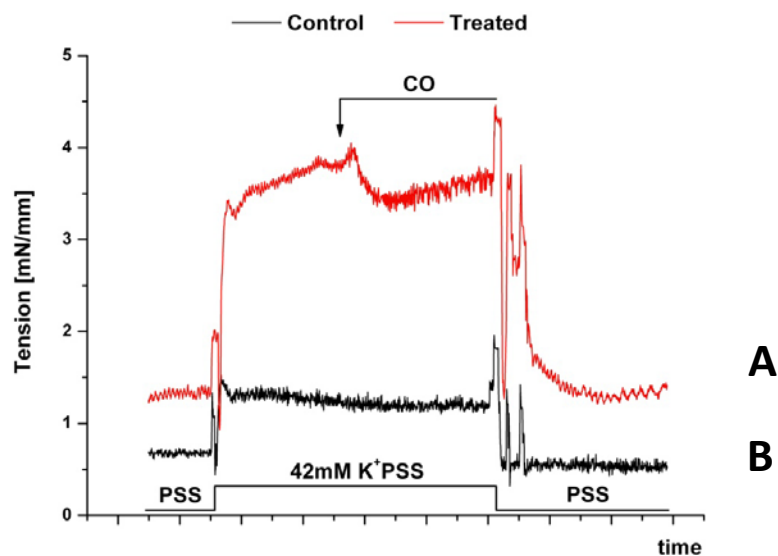
Фиг. 18. Оригинален запис, показващ ефект на ендогенния CO - еднократно въздействие с hemin (10 μ M).

Субстратът на NO – hemin, приложен в концентрация 10 μ M предизвика релаксаторен отговор на съдовата стена (**Фиг. 18**). Намаляването на съдовия тонус достигна до 62% от мускулния тонус при контролните съдови сегменти (**Фиг. 18**).



Фиг. 19. Влияние на ендогенен CO върху съдовият тонус на сегменти от *a. ophthalmica*: Control - нетретирани сегменти; Hemin – ефект на hemin (10 μ M) върху *a. ophthalmica*. Данните представят средно аритметично \pm SEM (***) $p < 0.001$, $n=5$).

Прилагането на екзогенен CO чрез аериране на работния разтвор със 100% въглероден оксид паралелно с аерацията с нормална газова смес, предизвиква намаляване на съдовия тонус (**Фиг. 20**) в сравнение с тонусът при контролните, нетретирани с екзогенен CO съдови сегменти.



Фиг. 20. Оригинален запис, показващ ефект на екзогенния CO – паралелна аерация на работния разтвор с въглероден оксид (100%). **A** – сегменти третирани с екзогенен CO; **B** – контролни сегменти.

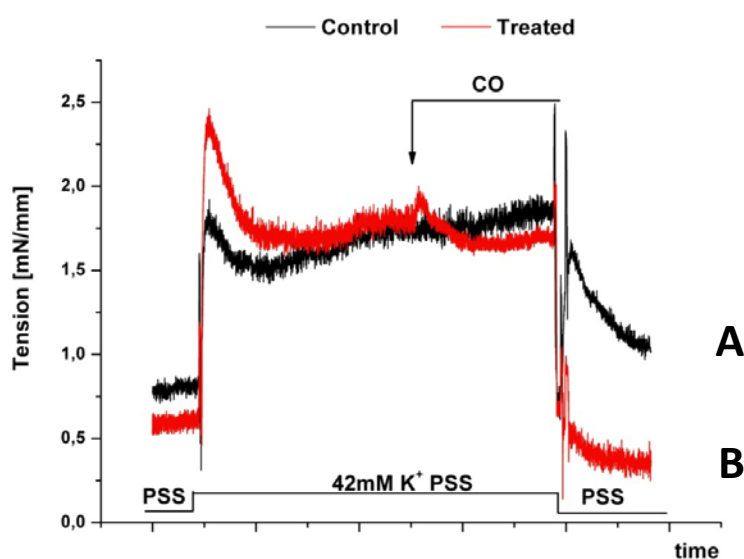
Резултатите, получени от експериментите за изследване влиянието на ендогенния CO върху *a. ophthalmica* показват, че понижаването на съдовия тонус се дължи на

отделения при разграждането на hemin въглероден оксид. Това действие на ендогенния и екзогенен CO е в унисон с предложената от Leffler и колеktiv (2006) схема на действието на ендогенния CO в мозъчни кръвоносни съдове.

Данните от експериментите за проучване влиянието на ендогенния CO върху *a. ophthalmica* с които разполагаме, дават основание за провеждане на допълнително изследване на точните механизми на въздействие и взаимодействие на ензимните системи при този модел на предизвикан оксидативен стрес.

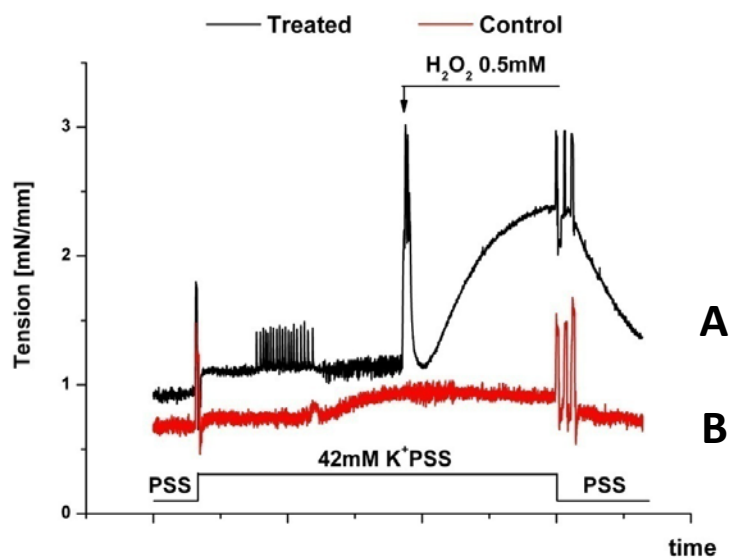
V.3. Промени в съкратителната активност под влияние на свободни кислородни форми – резултати и обсъждане.

При този експериментален протокол съдови сегменти бяха инкубирани с 0.5 mM H₂O₂ за 30 мин. преди преконтрахирането с 42mM K⁺ PSS. След стабилизиране на съдовият тонус, работният разтвор се аерираше със 100% CO паралелно с нормалната аерация (Фиг. 21).



Фиг. 21. Оригинален запис, показващ ефект на екзогенния CO. **A** – контролен, нетретиран сегмент; **B** – ефект върху третиран с H₂O₂ сегмент от *a. ophthalmica*.

Екзогенният CO предизвиква понижаване на съдовия тонус с до 10% в сравнение с тонуса при контролните съдови сегменти, аерирани единствено с нормална газова смес.



Фиг. 22. Оригинален запис, показващ ефект на H₂O₂. **A** – ефект на H₂O₂ (0.5 mM) върху сегмент от *a. ophthalmica*; **B** – контролен, нетретиран сегмент.

Въздействието с 0.5 mM H₂O₂, въведен еднократно в работния разтвор върху съдовият тонус на нетретиранни съдови сегменти, предизвика покачване на тонуса в сравнение с този при контролните съдови сегменти (**Фиг. 22**). Вероятно този ефект се дължи на негативното въздействие на H₂O₂ върху езимните системи NOS/NO и HO/CO и нарушаване на баланса в тяхното функциониране. Това води до намалено освобождаване на NO (CO), което успоредно с прякото въздействие на водородния пероксид води до повишаване на съдовия тонус.

VI. Заключение

Основната таргетна молекула на CO е желязния център в хема на хем-протеини, включително и каталаза, циклооксигеназа, Цитохром-с, COX, цитохром P450, простагландин ендопероксидсинтаза, sGC, Hb, Mb, NADPH-оксидаза, азотно окисна синтаза (NOS), пероксидази, Простагландин H синтаза и триптофан диоксигеназа (Wu a. Wang, 2005). Високите концентрации CO причиняват хипоксемия чрез конкурентно свързване на кислород-свързващите места на Hb, като афинитетът на CO е около 200-250 пъти по-висок от този на кислорода (Prockop a. Chichkova, 2007; Wu a. Wang, 2005).

Ниски нива на CO могат да повлияят на няколко сигнални пътища, включително тези, регулирани от sGC и/или MAPK (Morita et al., 1995; Maines, 1997; Otterbein et al., 2003; Ryter et al., 2004, Kim et al. 2006). sGC, физиологичният рецептор за NO, катализира превръщането на гуанозин-трифосфат (GTP) във вторичния посредник гуанозин-3,5-цикличен монофосфат (сGMP), което от своя страна играе ключова роля в редица физиологични процеси, включващи вазодилатация и невронална сигнална трансдукция (Hofmann, 2005; Moncada a. Higgs, 2006; Derbyshire a. Marletta, 2009; Friebed a. Koesling, 2009; Kleppisch a. Feil, 2009; Mergia et al., 2009; Domek-Lopacinska a. Strosznajder, 2010; Garthwaite, 2010). В допълнение към NO, sGC леко се активира от CO (Pal a. Kitagawa, 2010). За отбелязване е, че CO и екзогенни съединения като (YC-1) и (BAY 41-2272) синергично активират sGC до нива приблизително подобни на тези, предизвикани от NO (Pal a. Kitagawa, 2010; Martin et al., 2005). Тази индукция на sGC води до увеличаване на нивото сGMP и активирането на сGMP-зависимата протеин киназа (PKG), като по този начин се засягат няколко клетъчни функции на базата на действията на йонни канали, фосфодиестерази, и протеин кинази (Hofmann, 2005; Friebed a. Koesling, 2009; Lucas et al., 2000; Kaupp a. Seifert, 2002; Fiedler et al., 2006; Francis et al., 2005; Rybalkina et al., 2010; Cukkeman et al., 2011).

Както CO, така и последващото образуване на сGMP по веригата, са замесени в редица невронални сигнални процеси, включително обонятелна невротрансмисия (Kim et al., 2006). Освен това, чрез активиране sGC, CO е замесен в регулирането на тонуса на съдовете, в инхибирането на тромбоцитната агрегация, и в инхибирането на пролиферацията на гладкомускулните клетки (Pae et al., 2010). Предполага се, че CO може да бъде модулатор на нивата на сGMP чрез взаимодействие със сигналната система sGC/NO в мозъка. Също така се предполага, че невроналната (nNOS)/NO

система не е функционална в отсъствието на NO-2, като самият CO е достатъчен за възстановяване на физиологичните ефекти на NO (Wu a. Wang, 2005; Pae et al., 2010).

Взаимодействието на CO с йонни канали (по-специално с K^+ -каналите) представлява важен механизъм в основата на биологичните ефекти на CO. Семейството на K^+ канали се състои от зависими от напрежението (K_V), АТР-чувствителни (K_{ATP}) и Ca^{2+} -активирани (K_{Ca}) канали. Високо-проводимите K_{Ca} канали (BK_{Ca}) и Ca^{2+} -активируемите транзиентни K_{Ca} доказано се активират от CO (Wu a. Wang, 2005). Изследвана е също така и ролята на BK_{Ca} -каналите в регулацията на съдовия тонус, при определянето на продължителността на акционния потенциал и честотата, и в освобождаването на невротрансмитер (Salkoff et al., 2006). Изследвано е и че PKG-зависимо активиране на Na^+/Ca^{2+} -помпа от CO (Wu a. Wang, 2005) може да се повиши субмембранната Ca^{2+} концентрация в близост до BK_{Ca} каналите с тяхното последващо отваряне, което е потвърждение на получените от нашата работна група резултати при изследване на коронарна артерия на морско свинче (Gagov et al., 2003). Веднъж активиран, cGMP-пътя може да бъде податлив за активиране от CO чрез BK_{Ca} канали (Wu a. Wang, 2005). В допълнение на PKG-зависимия механизъм, е предположено, че самите директно стимулираните от CO BK_{Ca} канали са газови сензори (Hou et al., 2009). CO, действащ като газ или CO-освобождаващи молекули (CORMs) (Johnson et al., 2003), увеличава вероятността на отваряне на канал (White et al., 2000; Jaggar et al., 2002; Xi et al., 2004) дори при фрагменти от мембрани (Williams et al., 2004, Williams et al., 2008; Wu et al., 2002), което предполага възможността CO да модулира канал пряко или косвено чрез тясно свързани с канала протеини, вероятно в същия макромолекулен комплекс (Hou et al., 2009).

За отбелязване е, че CO също така инхибира активността на цитохром p450 и NADPH оксидазния цитохром b558, като тези хем-протеини могат да бъдат въввлечени в образуване на свободни радикали, оксидативен стрес, и индуцирана от оксидативен стрес апоптоза (Von Burg, 1999; Dulak a. Jozkowicz, 2003).

CO може да повиши образуването на ROS и про-възпалителни молекули, водещи до вредни ефекти в някои органи (например, в мозъка). В действителност е било показано, че CO увеличава образуването на про-възпалителни простагландини чрез активиране на COX в хипоталамусни експланти на плъхове и в първична култура на хипоталамусни астроцити на плъх, което предполага, че CO стимулира про-

възпалителни отговори най-малко в мозъка. Освен това, СО е показано, че намалява клетъчните нива на антиоксиданти (например, глутатион) чрез повишаване на митохондриалната ROS-формация чрез СО свързване към цитохром а3 мястото в комплекс IV, което показва, че СО може да предизвика окислително увреждане на тъканта (Kim et al., 2011).

Повишеното активиране на системата НО/СО може да има пагубни последици за нормалната хомеостаза, по-специално, НО-1 може да допринесе за тъканно увреждане при определени неблагоприятни обстоятелства. В частност, прекомерно активиране на НО и увеличението на крайните продукти (т.е. свободно желязо, BV и СО) могат да имат про-оксидантни, проапоптотични, про-възпалителни и про-пролиферативни ефекти. Прекомерното активиране на НО/СО системата при бозайници може да бъде свързано с няколко клинични условия, както и да изостри вирулентността и патогенни ефекти на някои микробни инфекции (Kinobe et al., 2008).

В някои тъкани и при определени условия, НО активност може да се счита за вредна в развитието и прогресирането на рак (Kinobe et al., 2008). В действителност, се спекулира, че цитозащитни ефекти на НО в раковите клетки могат да улеснят избягване на оксидативния стрес, насърчаване на резистентност към няколко терапии и увеличаване тумор оцеляване, растеж, инвазивност и метастази (Kinobe et al., 2008; Was et al., 2010). За отбелязване е, че регулация на НО-1 експресия е наблюдавана при някои тумори, включително аденокарцином, хронична миелоидна левкемия, хепатом, орално плоскоклетъчен карцином, лимфосарком, злокачествен меланом, олигодендроглиом, церебрален глиобластом и астроцитом рак на простатата, и бъбречно-клетъчен карцином (Kinobe et al., 2008; Was et al., 2010). Неблагоприятните въздействия поради активация на НО са строго свързани с освобождаването на свободни желязо (про-оксидант, който предизвиква оксидативен стрес и нараняване на тъканите), BV и СО (при увеличени клетъчните нива могат да насърчат или обострят патологични състояния, в зависимост от тъканта и обстоятелствата). Много заболявания, включително хемолитични, възпалителни, и окислителни състояния, са свързани с аномален СО метаболизъм и функции (Owens, 2010; Ghosh et al., 2010).

При някои свързани с възрастта невродегенеративни заболявания като болестта на Алцхаймер и Паркинсон е описана хронична свръхекспресия на НО-1, както и съпътстващо освобождаване на вътреклетъчно свободно желязо и СО, което може да

допринесе за достигане на аномални нива на отлагане на желязо в мозъка и митохондриална недостатъчност (Kinobe et al., 2008).

Екзогенният CO е отровен за хората и нарушава абсорбционния капацитет на Hb за O₂ (Raub, 1999; Prockop a. Chichkova, 2007; Goldstein, 2008; Wu a. Wang, 2005). Въпреки това, еукариотните организми използват ендогенен CO, произведена по време на разграждане хема от високо специализирани HO-ензими (Maines, 1988; McCoubrey et al., 1997; Liu a. Ortiz de Montellano, 2000; Wu a. Wang, 2005; Ryter et al., 2006; Piantadosi, 2008), като невротрансмитер и като физиологична сигнална молекула (Wu a. Wang, 2005; Bilban et al., 2008, Lakkisto et al., 2010). Като цяло, HO-зависимото ендогенно производство на CO в почти всички области на живота изглежда че подкрепя ключовата роля CO в много биологични процеси (Oelgeschlager a. Rother, 2008; Techtmann et al., 2009; Mörsdorf et al., 1992).

През последните години са направени пробиви в разбирането на системата HO/CO. Наскоро бе доказано, че ендогенният CO действа като цитозащитна и хомеостатична молекула с важна роля за сигнализиране във физиологични и патологични състояния. В действителност, при отчитане на антиапоптотични, противовъзпалителни, антиоксидантни, антипроли-феративни и съдоразширяващи ефекти на HO-1 и нейни крайни продукти *in vitro*, въглеродният оксид може да повлияе на няколко патофизиологични състояния (Wu a. Wang, 2005; Kim et al., 2006; Bilban et al., 2006; Ryter et al., 2006; Foresti et al., 2008). Към днешна дата, открито се обсъжда как експозицията на CO модулира молекулярната продукция на клетката, за да се индуцира хомеостатичен отговор след стрес-стимули (Bilban et al., 2008). Забележително е, че CO взаимодейства с няколко цели клетъчни хемопротеини, въпреки че функционалното значение на тези взаимодействия е все още ясно (Techtmann et al., 2009; Wu a. Wang, 2005; Ascenzi et al., 2007; Kajimura et al., 2010). Също така, CO, доставен като газ или чрез CORMs, показва терапевтичен потенциал при възпаление, сепсис, увреждане на белия дроб, сърдечно-съдови заболявания, трансплантация и рак, като това се поддържа от предклинични доказателства, в различни животински модели (Foresti et al., 2008; Motterlini et al., 2010). Технологиата вече е насочена в привеждане на CO в клинични приложения под формата на инхалаторна газова терапия или чрез потенциалното използване на парентерално- и орално активни CORMs. Въпреки това, предстои значителна работа и все още е

необходимо да се съпоставят тези външни ефекти, с тези, генерирани ендогенно (Foresti et al., 2008; Motterlini et al., 2010).

Накрая, взаимодействието между CO и други газове, като O₂, NO, и H₂S, се проявява основно в няколко патофизиологични състояния, включително митохондриално дишане; вазодилатация, ангиогенеза и съдово ремоделиране; възпаление и оксидативен и нитрозативен стрес (Kajimura et al., 2010; Pun et al., 2010; Li et al., 2009). Въпреки това, молекулярните механизми на действие на CO е трудно да се установят по-подробно. Всъщност, хем-протеините, играят ключова роля в производството на CO, осъществяваната от него сигнално предаване и взаимодействие, предоставят места за свързване, където газовите невротрансмитери може да взаимодействат помежду си и понижават концентрацията на определения свободен газ. По този начин концентрацията на свободния и свързан газ е трудно да се определи (Kajimura et al., 2010, Piantadosi, 2008; Pae et al., 2009; Li et al., 2009; Spillers, 2011).

VII. Изводи

1. Локализирането на NO-2 в миентеричните неврони, а на NO-1 главно в проекциите на миентеричните неврони инервиращи мускулната стена показва, че третирането с CoCl_2 и ЕПС ускорява транспортирането на ензима в еферентна посока.

2. Ендогенният CO отделен от гладкомускулните клетки, има незначителен ефект, проявяващ се само като намаление на релаксаторния отговор на гладката мускулатура при ЕПС в третираните животни.

3. Експресията на конститутивната NO-2 в гладкомускулните клетки на коронарните артерии участва в модулацията на съдовия тонус. Ефектът на субстрата на NO hemin в ниски концентрации показва, че се индуцира невронално-зависимо съкращение, докато при по-високи концентрации се причинява невронална и ендотел-независима релаксация на коронарна артерия.

4. Конститутивната NO-2 се експресира в съдовата стена на *a. ophthalmica*, индикация за което е намаляването на съдовия тонус при въздействие с hemin.

5. Оксидативен стрес причинен от свободни кислородни форми може да доведе до увеличаване на съдовия тонус, и намаляване на пропускливостта на съответните съдове. Системата NO/CO действа компенсаторно и спомага за възстановяване на кръвния ток.

VIII. Приноси

- За първи път е изследвана връзката и е установено взаимодействието между ензимните системи NOS/NO и HO/CO във фундус от стомах на морско свинче.
- Оригинални данни са получени при изследване въздействието *in vitro* на свободни кислородни форми при малки кръвоносни съдове. Показано е нарушаване на баланса във функциите на ензимните системи NOS/NO и HO/CO.
- За първи път е разработена и въведена методика за изолиране на *a. ophthalmica* при изследването ѝ *in vitro*.

IX. Литература

1. **Allen BG, Walsh MP.** The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction., Trends Biochem Sci., Sep 1994, Vol. 19, pp. 362-8.
2. **Altaparmacov I, Papasova M.** [In vivo and in vitro gastric electrical activity in patients with gastric or duodenal ulcer (author's transl)], Arch Fr Mal App Dig., Mar 1976, Vol. 2, pp. 135-44, [Article in French].
3. **Ambache N.** Unmasking, after cholinergic paralysis by botulinum toxin, of a reversed action of nicotine on the mammalian intestine, revealing the probable presence of local inhibitory ganglion cells in the enteric plexus., Br J Pharmacol Chemother, 1951, Vol. 6, pp. 51-67.
4. **Archakov A.I., Karuzina I.I., Petushkova N.A., Lisitsa A.V. and Zgoda V.G.** Production of carbon monoxide by cytochrome P450 during iron-dependent lipid peroxidation., Toxicol In Vitro, 2002, Vol. 16 , pp. 1–10.
5. **Atanassova E Kortezoza N, Papasova M.** Changes in the reactivity of the intrinsic nervous system of the stomach to hexamethonium after transthoracic vagotomy. Acta Physiol Pharmacol Bulg., 1986 , Vol. 12 , pp. 20-26.
6. **Atanassova E, Papasova M, Kortesoza N, Velkova V.** Changes in the spike activity of the stomach under the influence of the intrinsic nervous system. Acta Physiol Pharmacol Bulg., 1978 , Vol. 4, pp. 12-19.
7. **Ascenzi, P., Bellelli, A., Coletta, M., Colosimo, A., Falcioni, G., Giacometti, G. M., Ippoliti, R., Zolla, L., and Giardina, B.** Multiple strategies for O₂ transport: from simplicity to complexity. IUBMB Life, 2007, 59, 600–616.
8. **Bartlett PJ, Young KW, Nahorski SR, Challiss RA.** Single cell analysis and temporal profiling of agonist-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate, Ca²⁺, diacylglycerol, and protein kinase C signaling using fluorescent biosensors., J Biol Chem., Jun 10, 2005, Vol. 23, pp. 21837-46.
9. **Battish R., Cao GY, Lynn RB, Chakder S, Rattan S.** Heme oxygenase-2 distribution in anorectum: colocalization with neuronal nitric oxide synthase., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, Jan 2000, Vol. 278, pp. G148-155.

10. **Bayar MA, Erdem Y, Oztürk K, Beşçalti O, Caydere M, Yücel D, Buharali Z, Ustün H.** The effect of EGb-761 on morphologic vasospasm in canine basilar artery after subarachnoid hemorrhage., *J Cardiovasc Pharmacol.*, Sep 2003, Vol. 42, pp. 395-402.
11. **Bayguinov O, Atanassova E.** Changes in the character of the postsynaptic potentials of the fundic smooth-muscle cells after functional loading., *Acta Physiol Pharmacol Bulg.*, 1981, Vol. 7, pp. 3-10.
12. **Bayguinov O, Vogalis F, Morris B, Sanders KM.** Patterns of electrical activity and neural responses in canine proximal duodenum., *Am J Physiol.*, Dec 1992, Vol. 263, pp. G887-94.
13. **Beckman J.S.** Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite., *Chem Res Toxicol*, 1996, Vol. 9, pp. 836–844.
14. **Beckman J.S., A.G. Estevez, J.P. Crow, L. Barbeito** Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS., *Trends Neurosci*, 2001, Vol. 24, pp. S15–20.
15. **Benneth M.R.** Non-adrenergic non-cholinergic (NANC) transmission to smooth muscle: 35 years on, *Progr Neurobiol*, 1997, Vol. 52, pp. 159-195.
16. **Bilban, M., Haschemi, A., Wegiel, B., Chin, B. Y., Wagner, O., and Otterbein, L. E.** Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *J. Mol. Med.*, 2008, 86, 267–279.
17. **Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., and Kalayci O.** Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*. 2012; 5:9-19.
18. **Berridge MJ.** Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol.*, Nov 1, 2008, Vol. 586, pp. 5047-61.
19. **Bishop A., Yet SF, Lee ME, Perrella MA, Demple B** A key role for heme oxygenase-1 in nitric oxide resistance in murine motor neurons and glia., *Biochem Biophys Res Commun*, Dec 3, 2004, Vol. 325, pp. 3-9.
20. **Boeckxstaens GE Pelckmans PA** Nitric oxide and the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission., *Comp Biochem Physiol*, 1997, Vol. 118A, pp. 925-937.

21. **Boev K, Kortežova N, Papisova M.** Coordination between the longitudinal and circular layers of the stomach during the excitator-contractile process., *Acta Physiol Pharmacol Bulg.*, 1976, Vol. 2, pp. 15-22.
22. **Boyd CS, E. Cadenas** Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis., *Biol Chem*, 2002, Vol. 383, pp. 411–423.
23. **Burnstock G, Campbell G, Bennett M, Holman ME** Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli., *Nature*, 1963, Vol. 200, pp. 581-582.
24. **Burnstock G, Campbell G, Bennett M, Holman ME** Innervation of the guinea-pig taenia coli: are there intrinsic inhibitory nerves which are distinct from sympathetic nerves?, *Int J Neuropharmacol*, 1964, Vol. 3, pp. 163-166.
25. **Burnstock G, Satchell DG, Smythe A.** A comparison of the excitatory and inhibitory effects of nonadrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species., *Br J Pharmacol*, 1972, Vol. 46, pp. 234-242.
26. **Burnstock G.** Cholinergic, adrenergic, and purinergic neuromuscular transmission, *Fed Proc.*, 1977, Vol. 36, pp. 2434-8.
27. **Burnstock G.** Evolution of the autonomic innervation of visceral and cardiovascular systems in vertebrates., *Pharmacol Rev*, 1969, Vol. 21, pp. 247-324.
28. **Burnstock G.** Structure of smooth muscle and its innervation / ed. Bulbring E. Brading, A.F., Jones, A.W. and Tomita, T., London : Smooth Muscle, 1970, pp. 1-69.
29. **Burnstock G.** The non-adrenergic non-cholinergic nervous system., *Arch Int Pharmacodyn*, 1986, Vol. 280, pp. 1-15.
30. **Cai H. and Harrison DG.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress., *Circ Res.*, Nov 10, 2000, Vol. 87, pp. 840-4.
31. **Chen X, Liu L, Li Z.** Cardiovascular protective effects and NO-mediated cerebrovasorelaxant effects of extract of ginkgo biloba leaves, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.*, Sep 1998, Vol. 78, pp. 692-5, [Article in Chinese].

32. **Chihara S, Tomita T.** Mechanical and electrical responses to alpha-adrenoceptor activation in the circular muscle of guinea-pig stomach., *Br J Pharmacol.*, 1987, Vol. 4, pp. 789-98.
33. **Chin D, Means AR.** Calmodulin: a prototypical calcium sensor., *Trends Cell Biol.*, Aug 2000, Vol. 8, pp. 322-8.
34. **Chou SM, H.S. Wang, K. Komai** Colocalization of NOS and SOD1 in neurofilament accumulation within motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study., *J Chem Neuroanat*, 1996, Vol. 10, pp. 249–258.
35. **Coburn R.F., Williams W.J., White P. and Kahn S.B.** The production of carbon monoxide from hemoglobin in vivo., *J Clin Invest*, 1967, Vol. 46c, pp. 346–356.
36. **Coburn RF and Forman, HJ.** Carbon monoxide toxicity., In: *Handbook of Physiology. The Respiratory System. Gas Exchange.* Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., 1987, Vol. IV, p. 439.
37. **Coburn RF, Blakemore W.S. and Forster R.E.** Endogenous carbon monoxide production in man., *J Clin Invest*, 1963, Vol. 42, pp. 1172–1178.
38. **Cole WC, Sanders KM.** Characterization of macroscopic outward currents of canine colonic myocytes., *Am J Physiol.*, 1989, Vol. 257, pp. C461-9.
39. **Cukkemane, A., Seifert, R., and Kaupp, U. B.** Cooperative and uncooperative cyclic-nucleotide-gated ion channels. *Trends Biochem. Sci.*, 2011, 36, 55–64.
40. **Currò D, Preziosi P.** Non-adrenergic non-cholinergic relaxation of the rat stomach., *Gen Pharmacol*, 1998.
41. **Daniel EE.** Effect of sympathomimetic amines and angiotensin on active ion transport in smooth muscles., *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, Nov 1965, Vol. 158, pp. 131-8.
42. **De Feo TT and Morgan, K.G.** Calcium-force relationships as detected with aequorin in two different vascular smooth muscle of the ferret., *J. Physiol.*, 1985, Vol. 369, pp. 269-282.
43. **Derbyshire, E. R. and Marletta, M. A.** Biochemistry of soluble guanylate cyclase. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2009, 191, 17–31.

44. **Domek-Lopacinska, K. U. and Strosznajder, J. B.** Cyclic GMP and nitric oxide synthase in aging and Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.*, 2010, 41, 129–137.
45. **Dulak, J. and Jozkowicz, A.** Carbon monoxide—a “new” gaseous modulator of gene expression. *Acta Biochim. Pol.*, 2003, 50, 31–47.
46. **Duridanova DB, Gagov HS, Boev KK.** Two populations of smooth muscle cells in the guinea-pig gastric antrum., *Eur J Pharmacol.*, 1997a, Vol. 333, pp. 105-11.
47. **Duridanova DB, Gagov HS, Boev KK.** Two types of Ca(2+)-channels in cells from the circular layer of guinea-pig ileum., *Gen Physiol Biophys.*, 1993, Vol. 12, pp. 325-3.
48. **Duridanova DB, Gagov HS, Dimitrov SD, Boev KK.** Main components of voltage-sensitive K⁺ currents of the human colonic smooth muscle cells., *Digestion.*, 1997b, Vol. 98, pp. 479-88.
49. **Ellmark SH, Dusting GJ, Fui MN, Guzzo-Pernell N, Drummond GR.** The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle., *Cardiovasc Res.*, Feb 1, 2005, Vol. 65, pp. 495-504.
50. **Fahrenkrug J.** Transmitter role of vasoactive intestinal peptide., *Pharmacol Toxicol.*, 1993, Vol. 72, pp. 354-363.
51. **Farmer E.E. and Mueller M J.** ROS-Mediated Lipid Peroxidation and RES-Activated Signaling. *Annual Review of Plant Biology.* 2013, Vol. 64, pp. 429-450.
52. **Fiedler, B., Feil, R., Hofmann, F., Willenbockel, C., Drexler, H., Smolenski, A., Lohmann, S. M., and Wollert, K. C.** cGMP-dependent protein kinase type I inhibits TAB1-p38 mitogen-activated protein kinase apoptosis signaling in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 32831–32840.
53. **Filo RS, Bohr DF, Ruegg JC.** Glycerinated Skeletal and Smooth Muscle: Calcium and Magnesium Dependence, *Science*, 1965, Vol. 147, pp. 1581-3.
54. **Foresti, R., Bani-Hani, M. G., Motterlini, R.** Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. *Intensive Care Med.*, 2008, 34, 649–658.
55. **Foresti R and Motterlini R.** The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis, *Free Radic Res.*, 1999, Vol. 31, pp. 459-75.

56. **Francis, S. H., Blount, M. A., Zoraghi, R., and Corbin, J. D.** Molecular properties of mammalian proteins that interact with cGMP: protein kinases, cation channels, phosphodiesterases, and multi-drug anion transporters. *Front. Biosci.*, 2005, 10, 2097–2117.
57. **Friebe, A. and Koesling, D.** The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models. *Nitric Oxide*, 2009, 21, 149–156.
58. **Furness J.B. and Costa M.** Types of nerves in the enteric nervous system, *Neuroscience*, 1980, Vol. 5, pp. 1-20.
59. **Gagov H., Kadinov B, Hristov K, Boev K, Itzev D, Bolton T, Duridanova D.** Role of constitutively expressed heme oxygenase-2 in the regulation of guinea pig coronary artery tone., *Pflugers Arch.*, Jul. 2003, Vol. 446, pp. 412-21.
60. **Gagov HS, Duridanova DB, Boev KK.** Inhibition of Ca²⁺ current in ileal cells by cyclopiazonic acid and ryanodine., *Eur J Pharmacol.*, 1993a, Vol. 243, pp. 19-24.
61. **Gagov HS, Duridanova DB, Boev KK.** Participation of calcium, released from the IP₃-sensitive Ca-store in activation of Ca-dependent potassium conductance of ileal smooth muscle cells., *Gen Physiol Biophys.*, 1993b, Vol. 12, pp. 199-211.
62. **Ganitkevich VY.** Ca²⁺-induced Ca²⁺ Release in Single Isolated Smooth Muscle Cells, *Smooth Muscle Excitation / ed. T. Bolton T.B. and Tomita/*, Academic Press, 1996, pp. 325-336.
63. **Garthwaite J.** Concept of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci.* 2008; Vol. 27: 2783-2802.
64. **Garthwaite, J.** New insight into the functioning of nitric oxidereceptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. *Mol. Cell Biochem.*, 2010, 334, 221–232.
65. **Ghosh, S., Gal, J., and Marczin, N.** Carbon monoxide: endogenous mediator, potential diagnostic and therapeutic target. *Ann. Med.*, 2010, 42, 1–12.
66. **Goldstein, M.** Carbon monoxide poisoning. *J. Emerg. Nurs.*, 2008, 34, 538–542.

67. **Goldstein S. and Czapski G.** The reaction of NO with O₂ and HO₂: a pulse radiolysis study., *Free Radical Biol Med*, 1995, Vol. 19, pp. 505–510.
68. **Gong MC, Cohen P, Kitazawa T, Ikebe M, Masuo M, Somlyo AP, Somlyo AV.** Myosin light chain phosphatase activities and the effects of phosphatase inhibitors in tonic and phasic smooth muscle., *J Biol Chem.*, 1992, Vol. 267, pp. 14662-8.
69. **Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R.** A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall., *Circ Res.*, Jul 7, 2000, Vol. 87, pp. 26-32.
70. **Gorman D, Drewry A., Huang Y.L. and Sames C.** The clinical toxicology of carbon monoxide., *Toxicology*, 2003, Vol. 187, pp. 25–38.
71. **Gray H.** *Anatomy of the Human Body*, 1918, 20th.
72. **Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW.** Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells., *Circ Res.*, Jun 1994, Vol. 74, pp. 1141-8.
73. **Guengerich F.P. and Shimada T.** Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes., *Chem Res Toxicol*, 1991, Vol. 4, pp. 391–407.
74. **Guzik TJ, Sadowski J, Kapelak B, Jopek A, Rudzinski P, Pillai R, Korbust R, Channon KM.** Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression in human arteries and veins., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2004, Vol. 24, pp. 1614-20.
75. **Gwynne R.M., Bornstein J. C.** Synaptic Transmission at Functionally Identified Synapses in the Enteric Nervous System: Roles for Both Ionotropic and Metabotropic Receptors *Curr Neuropharmacol.* 2007;5(1):1-17.
76. **Hara Y, Kubota M, Szurszewski JH.** Electrophysiology of smooth muscle of the small intestine of some mammals., *J Physiol.*, 1986, Vol. 372, pp. 501-20.
77. **Harnett KM, Biancani P.** Calcium-dependent and calcium-independent contraction in smooth muscles. *Am J Med.* 2003;115:24S-30S.

78. **Hartshorne DJ.** Biochemistry of the contractile process in smooth muscle // *Physiology of the Gastrointestinal Tract* / ed. Johnson L.R., New York : Raven Press, 1987, Vol. 2, pp. 423-482.
79. **Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T.** Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease., *Circulation*, Jun 2001, Vol. 26, pp. 583-93.
80. **Hesselund A., Jeppesen, P., Aalkjaer, C. and Toke, B.** Characterization of vasomotion in porcine retinal arterioles., 2003, Vol. 81, pp. 278-282.
81. **Hilgers RH, Webb RC** Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho, *Exp Biol Med* (Maywood), 2005, Vol. 230, pp. 829-835.
82. **Hill MA, Zou H, Potocnik SJ, Meininger GA, Davis MJ.** Invited review: arteriolar smooth muscle mechanotransduction: Ca(2+) signaling pathways underlying myogenic reactivity., *J Appl Physiol*, 2001, Vol. 91, pp. 973-83.
83. **Himpens B, Missiaen L, Casteels R.** Ca²⁺ homeostasis in vascular smooth muscle., *J Vasc Res.*, 1995, Vol. 32, pp. 207-19.
84. **Hofmann, F.** The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 1–4.
85. **Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG.** Mechanisms of smooth muscle contraction., *Physiol Rev.*, 1996, Vol. 76, pp. 967-1003.
86. **Hou, S., Heinemann, S. H., and Hoshi, T.** Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules. *Physiology* (Bethesda), 2009, 24, 26–35.
87. **Hristov K, Altankova I, Gagov H, Bolton T, Boev KK, Duridanova D.** Calcium-dependent changes in potassium currents in guinea-pig coronary artery smooth muscle cells after acute cobalt loading in vivo., *Pflugers Arch.*, Oct 2004, Vol. 1, pp. 16-25.
88. **Hu SL, Yamamoto Y, Kao CY.** The Ca²⁺-activated K⁺ channel and its functional roles in smooth muscle cells of guinea pig taenia coli., *J Gen Physiol.*, 1989, Vol. 94, pp. 833-47.

89. **Huie RE and Padmaja, S** The reaction of NO with superoxide., *Free Radical Res Commun*, 1993, pp. 195–199.
90. **Hybertsona B.M., Gaoa B., Bosea S.K. and McCorda J.M.** Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*. 2011, Vol. 32, pp. 234-46.
91. **Hyun DH, M. Lee, N. Hattori, S. Kubo, Y. Mizuno, B. Halliwell, P. Jenner** Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome., *J Biol Chem*, 2002, Vol. 277, pp. 28572–28577.
92. **Ichikawa S, Bozler E.** Monophasic and diphasic action potentials of the stomach., *Am J Physiol.*, Jul 1955, Vol. 182, pp. 92-6.
93. **Imai T, Morita T, Shindo T, Nagai R, Yazaki Y, Kurihara H, Suematsu M, Katayama S.** Vascular smooth muscle cell-directed overexpression of heme oxygenase-1 elevates blood pressure through attenuation of nitric oxide-induced vasodilation in mice. *Circ Res.*, 2001, Vol. 89, pp. 55–62.
94. **Jacobson GM, Dourron HM, Liu J, Carretero OA, Reddy DJ, Andrzejewski T, Pagano PJ.** Novel NAD(P)H oxidase inhibitor suppresses angioplasty-induced superoxide and neointimal hyperplasia of rat carotid artery., *Circ Res.*, Apr 4, 2003, Vol. 92, pp. 637-43.
95. **Jaggar, J. H., Leffler, C. W., Cheranov, S. Y., Tcheranova, D. E. S., and Cheng, X.** Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca²⁺ sparks to Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ. Res.*, 2002, 91, 610–617.
96. **Jiang H, Stephens NL.** Calcium and smooth muscle contraction., *Mol Cell Biochem.*, 1994, Vol. 135, pp. 1-9.
97. **Johnson, T. R., Mann, B. E., Clark, J. E., Foresti, R., Green, C. J., and Motterlini, R.** Metal carbonyls: a new class of pharmaceuticals? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2003, 42, 3722–3729.
98. **Johnson ME, Sill JC, Uhl CB, Halsey TJ, Gores GJ.** Effect of volatile anesthetics on hydrogen peroxide-induced injury in aortic and pulmonary arterial endothelial cells., *Anesthesiology*, Jan 1996, Vol. 84, pp. 103-16.

99. **Kajimura, M., Fukuda, R., Bateman, R. M., Yamamoto, T., and Suematsu, M.** Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H₂S gas biology. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010, 13, 157–192.
100. **Kaupp, U. B. and Seifert, R.** Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.*, 2002, 82, 769–824.
101. **Kim, Y. M., Pae, H. O., Park, J. E., Lee, Y. C., Woo, J. M., Kim, N. H., Choi, Y. K., Lee, B. S., Kim, S. R., and Chung, H. T.** Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.*, 2011, 14, 137–167.
102. **Kim, H. P., Ryter, S. W., and Choi, A. M.** CO as a cellular signaling molecule. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2006, 46, 411–449.
103. **Kinobe, R. T., Dercho, R. A., and Nakatsu, K.** Inhibitors of the heme oxygenase–carbon monoxide system: on the doorstep of the clinic? *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2008, 86, 577–599.
104. **Kitazawa T, Kobayashi S, Horiuti K, Somlyo AV, Somlyo AP.** Receptor-coupled, permeabilized smooth muscle. Role of the phosphatidylinositol cascade, G-proteins, and modulation of the contractile response to Ca²⁺., *J Biol Chem.*, 1989, Vol. 10, pp. 5339-42.
105. **Kleppisch, T. and Feil, R.** cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2009, 191, 549–579.
106. **Klockner U.** Voltage-dependent L-type calcium channels in smooth muscle cells. // *Smooth Muscle Excitation* / ed. T. Bolton T.B. and Tomita, Academic Press, 1996, pp. 1-12.
107. **Krueger JK, Gallagher SC, Wang CA, Trewhella J.** Calmodulin remains extended upon binding to smooth muscle caldesmon: a combined small-angle scattering and fourier transform infrared spectroscopy study., *Biochemistry*, Apr 11, 1997, Vol. 14, pp. 3979-87.
108. **Krumenacker J.S., Hanafy K.A. and Murad F.** Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull.* 2004;62:505-515.

109. **Lakkisto, P., Kyto", V., Forsten, H., Siren, J. M., Segersva"rd, H., Voipio-Pulkki, L. M., Laine, M., Pulkki, K., and Tikkanen, I.** Heme oxygenase-1 and carbon monoxide promote neovascularization after myocardial infarction by modulating the expression of HIF-1alpha, SDF- 1alpha and VEGF-B. *Eur. J. Pharmacol.*, 2010, 635, 156–164.
110. **Langley JN.** On inhibitory fibres in the vagus for the end of the oesophagus and the stomach., *J. Physiol*, 1898, Vol. 23, pp. 407-414.
111. **Langley JN.** *The Autonomic nervous system*, Cambridge: 1920.
112. **Laursen JB Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG.** Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension., *Circulation*, Feb 4, 1997, Vol. 95, pp. 588-93.
113. **Lee CH, Poburko D, Kuo KH, Seow CY, van Breemen C.** Ca(2+) oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, May 2002, Vol. 5, pp. H1571-83.
114. **Leffler CW, Parfenova H, Jaggar JH, Wang R.** Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation, *J Appl Physiol.*, 2006, Vol. 100, pp. 1065-76.
115. **Levonen AL, Patel RP, Brookes P, Go YM, Jo H, Parthasarathy S, Anderson PG, Darley-USmar VM.** Mechanisms of cell signaling by nitric oxide and peroxynitrite: from mitochondria to MAP kinases. *Antioxid Redox Signal.* 2001, Vol. 3, pp. 215–229.
116. **Li, L., Hsu, A., and Moore, P. K.** Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation - a tale of three gases! *Pharmacol. Ther.*, 2009, 123, 386–400.
117. **Li Y., Wang H., Yang B., Yang J., Ruan X., Yang Y., Wakeland E. K., Li Q. and Fang X.** Influence of carbon monoxide on growth and apoptosis of human umbilical artery smooth muscle cell and vein endothelial cells. *Int J Biol Sci.* 2012, Vol. 8, No 10, pp. 1431-46.
118. **Lincoln TM.** Myosin phosphatase regulatory pathways: different functions or redundant functions?, *Circ Res.*, Jan 5, 2007, Vol. 1, pp. 10-2.

119. **Liu Y., and Ortiz de Montellano, P.R.** Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1., *J Biol Chem*, 2000, Vol. 275, pp. 5297 – 5307.
120. **Love JA and Szurszewski JH.** The electrophysiological effects of vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig inferior mesenteric ganglion., *J Physiol.*, 1987, Vol. 394, pp. 67-84.
121. **Lucas, L., del Peso, L., Rodriguez, P., Penalva, V., and Lacal, J. C.** Ras protein is involved in the physiological regulation of phospholipase D by platelet derived growth factor. *Oncogene*, 2000, 19, 431–437.
122. **MacMicking J, Q.W. Xie, C. Nathan.** Nitric oxide and macrophage function., *Annu. Rev. Immunol*, 1997, Vol. 15, pp. 323–350.
123. **Maines MD.** Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.*, 1988, Vol. 2, 2557–2568.
124. **Maines MD.** The heme oxygenase system: a regulator of second, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997, Vol. 37, pp. 517–554.
125. **Mandrek K. and Golenhofen K.** Phasic-rhythmical and tonic components in gastrointestinal motility., *Prog Clin Biol Res.*, 1990, Vol. 327, pp. 463-81.
126. **Marczin N, Ryan US, Catravas JD** Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and endothelium-derived relaxing factor-induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion., *J Pharmacol Exp Ther.*, Oct 1992, Vol. 263, pp. 170-9.
127. **Martin, E., Czarnecki, K., Jayaraman, V., Murad, F., and Kincaid, J.** Resonance Raman and infrared spectroscopic studies of highoutput forms of human soluble guanylyl cyclase. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 4625–4631.
128. **Martinsin J.** Studies on the efferent vagal control of the stomach., *Acta Physiol Scand*, 1965, Vol. 65, pp. 1-23.
129. **Mazza GJ.** Anthocyanins and heart health., *Ann Ist Super Sanita*, 2007, Vol. 43, pp. 369-74.

130. **McDonald J.W.** Repairing the damaged spinal cord., *Sci. Am*, 1999, Vol. 281, pp. 64–73.
131. **McCoubrey, W. K., Jr., Huang, T. J., and Maines, M. D.** Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.*, 1997, 247, 725–732.
132. **McSwiney BA and Robson JM.** The response of smooth muscle to stimulation of the vagus nerve., 1929, Vol. 68, pp. 124-131.
133. **Mehlhase J, T. Grune** Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells., *Biol Chem*, 2002, Vol. 383, pp. 559–567.
134. **Mergia, E., Koesling, D., and Friebe, A.** Genetic mouse models of the NO receptor ‘soluble’ guanylyl cyclases. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2009, 191, 33–46.
135. **Missiaen L, De Smedt H, Droogmans G, Casteels R.** Luminal Ca²⁺ controls the activation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cytosolic Ca²⁺., *J Biol Chem.*, 1992a, Vol. 267, pp. 22961-6.
136. **Missiaen L, De Smedt H, Droogmans G, Himpens B, Casteels R.** Calcium ion homeostasis in smooth muscle., *Pharmacol Ther.*, Nov 1992b, Vol. 56, pp. 191-231.
137. **Monagas M, Hernández-Ledesma B, Garrido I, Martín-Alvarez PJ, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B.** Quality assessment of commercial dietary antioxidant products from *Vitis vinifera* L. grape seeds., *Nutr Cancer*, 2005, Vol. 53, pp. 244-54.
138. **Moncada, S. and Higgs, E. A.** Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2006, 213–254.
139. **Morita, T., Perrella, M. A., Lee, M. E., and Kourembanas, S.** Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 1475–1479.
140. **Mörsdorf, G., Frunzke, K., Gadkari, D., and Meyer, O.** Microbial growth on carbon monoxide. *Biodegradation*, 1992, 3, 61–82.

141. **Motterlini R, Clark JE, Foresti R. et al.** Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ Res.* 2002, Vol. 90, pp. E17-24.
142. **Motterlini, R. and Otterbein, L. E.** The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2010, 9, 728–743.
143. **Mulvany M.J. and Halpern, W.** Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats, 1977, Vol. 41, pp. 19-26.
144. **Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N.** Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 9;338(1):668-76. Epub 2005 Aug 19.
145. **Ny L, Alm P, Larsson B, Andersson KE** Morphological relations between haem oxygenases, NO-synthase and VIP in the canine and feline gastrointestinal tracts, *J Auton Nerv Syst*, Jul 14, 1997, Vol. 65, pp. 49-56.
146. **Oh SJ, Kim S.K. and Kim Y.C.** Role of glutathione in metabolic degradation of dichloro-methane in rats., *Toxicol Lett*, 2002, Vol. 129, pp. 107–114.
147. **Oelgeschlager, E. and Rother, M.** Carbon monoxide-dependent energy metabolism in anaerobic bacteria and archaea. *Arch. Microbiol.*, 2008, 190, 257–269.
148. **Otterbein, L. E., Otterbein, S. L., Ifedigbo, E., Liu, F., Morse, D. E., Fearn, C., Ulevitch, R. J., Knickelbein, R., Flavell, R. A., and Choi, A. M.** MKK3 mitogen-activated protein kinase pathway mediates carbon monoxide-induced protection against oxidant-induced lung injury. *Am. J. Pathol.*, 2003, 163, 2555–2563.
149. **Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K. et al.** Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 2003, Vol. 24, pp. 449-55.
150. **Owens, E. O.** Endogenous carbon monoxide production in disease. *Clin. Biochem.*, 2010, 43, 1183–1188.
151. **Papasova M, Boev K, Bonev A, Milusheva E.** Relationship between the changes in the membrane potential and the contraction of the smooth muscles of the lower oesophageal sphincter and the ileocaecal sphincter., *Agressologie*, 1981, Vol. 5, pp. 205-8.

152. **Pae, H. O., Lee, Y. C., Jo, E. K., and Chung, H. T.** Subtle interplay of endogenous bioactive gases (NO, CO and H₂S) in inflammation. *Arch. Pharm. Res.*, 2009, 32, 1155–1162.
153. **Pae, H. O., Son, Y., Kim, N. H., Jeong, H. J., Chang, K. C., and Chung, H. T.** Role of heme oxygenase in preserving vascular bioactive NO. *Nitric Oxide*, 2010, 23, 251–257.
154. **Pal, B. and Kitagawa, T.** Binding of YC-1/BAY 41-2272 to soluble guanylate cyclase: a new perspective to the mechanism of activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, 397, 375–379.
155. **Papasova M, Velkova V, Atanassova E.** Character of the gastric and duodenal electrical activity after blocking of the adrenoactive structures., *Acta Physiol Pharmacol Bulg.*, 1979, Vol. 5, pp. 3-10.
156. **Papasova M, Velkova V, Atanassova E.** Increase in the intestinal slow-wave frequency below the transection through electrical stimulation., *Acta Physiol Pharmacol Bulg.*, 1977, Vol. 3, pp. 3-11.
157. **Papasova MP, Nagai T, Prosser CL** Two-component slow waves in smooth muscle of cat stomach., *Am J Physiol.*, 1968, Vol. 4, pp. 695-702.
158. **Paravicini TM, Chrissobolis S, Drummond GR, Sobey CG.** Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo., *Stroke*, Feb 2004, Vol. 35, pp. 584-9.
159. **Paravicini TM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR.** Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits., *Circ Res.*, Jul 12, 2002, Vol. 91, pp. 54-61.
160. **Pato MD, Tulloch AG, Walsh MP, Kerc E.** Smooth muscle phosphatases: structure, regulation, and function., *Can J Physiol Pharmacol.*, Nov 1994, Vol. 72, pp. 1427-33.
161. **Paton WDM and Vane JR.** An analysis of the responses of the isolated stomach to electrical stimulation and to drugs., *J Physiol*, 1963, Vol. 165, pp. 10-46.

162. **Petkov GV, Fusi F, Saponara S, Gagov HS, Sgaragli GP, Boev** Characterization of plasma membrane calcium currents in freshly isolated smooth muscle cells from rat tail main artery, *Acta Physiol Scand*, 2001, Vol. 173, pp. 1-9.
163. **Pfitzer G.** Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle., *J Appl Physiol*, Jul 2001, Vol. 1, pp. 497-503.
164. **Piantadosi, C. A.** Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, 45, 562–569.
165. **Piantadosi CA, Zhang J., Levin E.D., Folz R.J. and Schmechel D.E.** Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat., *Exp Neurol*, 1997, Vol. 147, pp. 103–114.
166. **Prockop, L. D. and Chichkova, R. I.** Carbon monoxide intoxication: an updated review. *J. Neurol. Sci.*, 2007, 262, 122–130.
167. **Proctor PH and Reynolds ES** Free radicals and disease in man., *Physiol Chem Phys Med NMR*, 1984, Vol. 3, pp. 175-95.
168. **Pun, P. B., Lu, J., Kan, E. M., and Moochhala, S.** Gases in the mitochondria. *Mitochondrion*, 2010, 10, 83–93.
169. **Radi R A., Cassina, R. Hodara** Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria, *Biol Chem*, 2002, Vol. 383, pp. 401–409.
170. **Raub J.** Carbon monoxide., *IPCSINCHEM* 213, 1999.
171. **Rybalkina, I. G., Tang, X. B., and Rybalkin, S. D.** Multiple affinity states of cGMP-specific phosphodiesterase for sildenafil inhibition defined by cGMP-dependent and cGMP-independent mechanisms. *Mol. Pharmacol.*, 2010, 77, 670–677.
172. **Ryter S. W., Otterbein L. E.** Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays*. 2004, Vol. 26, pp. 270-80.
173. **Ryter S.W., Alam J. and Choi A.M.K.** Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications, *Physiol Rev*, 2006, Vol. 86, pp. 583-650.

174. **Ryter, S. W., Morse, D., and Choi, A. M.** Carbon monoxide: to boldly go where NO has gone before. *Sci. STKE*, 2004, 230, RE6.
175. **Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., and Wei, A.** Highconductance potassium channels of the SLO family. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2006, 7, 921–931.
176. **Sanders KM and Publicover NG.** Excitation-contraction coupling in gastric muscles., *Dig Dis Sci.*, Dec 1994, Vol. 12 Suppl, pp. 69S-72S.
177. **Sharma HS, Westman J, Olsson Y, Alm P** Involvement of nitric oxide in acute spinal cord injury: an immunocytochemical study using light and electron microscopy in the rat., *Neurosci Res*, 1996, Vol. 24, pp. 373–384.
178. **Shinoda Y, Suematsy, M., Wakabayashi, Y., Goda, N., Suzuki, T., Saito, S., Yamaguchi, T., Ishimura, Y.** Carbon monoxide as a regulator of bile canalicular contractility in cultured rat hepatocytes, *Hepatology*, 1998, Vol. 28, pp. 286–95.
179. **Shuttleworth CWR and Keef KD.** Roles of peptides in enteric neuromuscular transmission., *Regul Pept*, 1995, Vol. 56, pp. 101-120.
180. **Sjostrand T.** Endogenous production of carbon monoxide in man under normal and pathophysiological conditions., *Scand J Clin Lab Invest*, 1949, Vol. 1, pp. 201–214.
181. **Sjostrand T.** The formation of carbon monoxide by the decomposition of hemoglobin in vivo., *Acta Physiol Scand*, 1952, Vol. 26, pp. 338–344.
182. **Smith R.P.** Toxic responses of the blood. / ed. Klaassen CD Amdur MO, and Doull J. New York: MacMillan., Casarett and Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons, 1986, 3rd ed., pp. 223–244.
183. **Somlyo AP and Himpens B.** Cell calcium and its regulation in smooth muscle., *FASEB J.*, Sep 1989, Vol. 3, pp. :2266-76.
184. **Somlyo AP and Somlyo AV.** Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase., *Physiol Rev.*, Oct 2003, Vol. 4, pp. 1325-58.

185. **Somlyo AP and Somlyo AV.** Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II., *J Physiol.*, Jan 15, 2000, Vol. Pt 2, pp. 177-85.
186. **Somlyo AP and Somlyo AV.** Smooth muscle: excitation-contraction coupling, contractile regulation, and the cross-bridge cycle., *Alcohol Clin Exp Res.*, Aug 1994, Vol. 1, pp. 138-43.
187. **Somlyo AV and Somlyo AP.** Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle., *J Pharmacol Exp Ther.*, 1968, Vol. 159, pp. 129-45.
188. **Spillers, J. G.** Carbon monoxide or nitric oxide: which came first? *South Med. J.*, 2011, 104, 9–10.
189. **Stewart RD, Fisher T.N., Hosko M.J., Peterson J.E., Baretta E.D. and Dodd H.C.** Carboxyhemoglobin elevation after exposure to dichloromethane., *Science*, 1972, Vol. 176, pp. 295–296.
190. **Stocker R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., and Ames, B.N.** Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance., *Science*, 1987, Vol. 235, pp. 1043 – 1046.
191. **Stone JR and Marletta MA.** Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*. 1994, Vol.33, pp. 5636 –5640.
192. **Suematsu M., Goda, N., Sano, T., Kashiwagi, S., Egawa, T., Shinoda, Y., Ishimura, Y.** Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused cat liver., *J. Clin. Invest.*, 2000, Vol. 96, pp. 2431–7.
193. **Suzuki K, Ito KM, Minayoshi Y, Suzuki H, Asano M, Ito K.** Modification by charybdotoxin and apamin of spontaneous electrical and mechanical activity of the circular smooth muscle of the guinea-pig stomach., *Br J Pharmacol.*, Jul 1993, Vol. 103, pp. 661-6.
194. **Tamir S, S. Burney, S.R. Tannenbaum** DNA damage by nitric oxide., *Chem Res Toxicol*, 1996, Vol. 9, pp. 821–827.

195. **Taylor DA and Bywater, RAR** Novel autonomic neurotransmitters and intestinal function., *Pharmac. Ther.*, 1989, Vol. 40, pp. 401-438.
196. **Taylor DA and Stull JT** Calcium dependence of myosin light chain phosphorylation in smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.*, 1988, Vol. 264, pp. 6206-6213.
197. **Taylor JP, J. Hardy, K.H. Fischbeck** Toxic proteins in neurodegenerative disease, *Science*, 2002, Vol. 296, pp. 1991–1995.
198. **Tenhunen R, Marver H, and Schmid R.** Microsomal heme oxygenase, characterization of the enzyme., *J Biol Chem*, 1969, Vol. 244, pp. 6388–6394.
199. **Techtman, S. M., Colman, A. S., and Robb, F. T.** ‘That which does not kill us only makes us stronger’: the role of carbon monoxide in thermophilic microbial consortia. *Environ. Microbiol.*, 2009, 11, 1027–1037.
200. **Thom SR.** Leucocytes in carbon monoxide mediated brain oxidative injury, *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993, Vol. 123, pp. 234–247.
201. **Thom S.R.** Carbon monoxide mediated brain lipid peroxidation in the rat., *J Appl Physiol*, 1990, Vol. 68, pp. 997–1003.
202. **Thorup C, Jones CL, Gross SS, Moore LC, Goligorsky MS.** Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol.*, 1999; Vol. 277, pp. F882–F889.
203. **Toda N. and Herman AG** Gastrointestinal function regulation by nitrergic efferent nerves., *Pharmacol*, 2005, Vol. 57, pp. 315-338.
204. **Tyrrell R.M.** Approaches to define pathways of redox regulation of a eukaryotic gene: the heme oxygenase 1 example., *Methods*, 1997, Vol. 11, pp. 313 – 318.
205. **Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK.** p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells., *J Biol Chem.*, Sep 20, 1996, Vol. 271, pp. 23317-21.

206. **Velkova V, Papisova M, Boev K, Bonev A.** Inhibitory action of acetylcholine on the smooth muscle from the lower esophageal sphincter., *Acta Physiol Pharmacol Bulg.*, 1979, Vol. 5, pp. 11-9.
207. **Vesely MJ, Exon DJ, Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R** Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells: hemin and sodium nitroprusside are regulators in vitro., *Am J Physiol*, 1998, Vol. 275, pp. C1087-C1094.
208. **Von Berg R.** Toxicology update. Carbon monoxide., *J Appl Toxicol*, 1999, Vol. 19, pp. 379–386.
209. **Vreman H.J., Wong R.J. and Stevenson D.K.** Carbon monoxide in breath, blood, and other tissues. / ed. DG. Penney, Boca Raton, FL: CRC : Carbon Monoxide Toxicity, 2000, pp. 19–60.
210. **Vreman H.J., Wong R.J., Sanesi C.A., Dennery P.A. and Stevenson D.K.** Simultaneous production of carbon monoxide and thiobarbituric acid reactive substances in rat tissue preparations by an iron-ascorbate system., *Can J Physiol Pharmacol*, 1998, Vol. 76, pp. 1057–1065.
211. **Walsh MP and Hartshorne DJ** Calmodulin / *The Biochemistry of Smooth Muscle* / ed. Stephens N.L., Boca Raton : CRC Press, 1983, Vol. 2, pp. 1-84.
212. **Walsh MP** Calmodulin and the regulation of smooth muscle, *Mol. Cell. Biochem.*, 1994, Vol. 135, pp. 21-41.
213. **Ward SM, Dalziel HH, Khoyi MA, Westfall AS, Sanders KM, Westfall DP.** Hyperpolarization and inhibition of contraction mediated by nitric oxide released from enteric inhibitory neurones in guinea-pig taenia coli., *Br J Pharmacol.*, 1996, Vol. 118, pp. 49-56.
214. **Was, H., Dulak, J., and Jozkowicz, A.** Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. *Curr. Drug Targets*, 2010, 11, 1551–1570.
215. **Waterman E and Lockwood B.** Active components and clinical applications of olive oil., *Altern Med Rev.*, Dec 2007, Vol. 12, pp. 331-42.

216. **Weaver L.K.** Carbon monoxide poisoning., *Crit Care Clin*, 1999, Vol. 15, pp. 297-317.
217. **White, R. E., Kryman, J. P., El Mowafy, A. M., Han, G., and Carrier, G. O.** cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BKCa channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Circ. Res.*, 2000, 86, 897–905.
218. **Williams DA, Becker PL, Fay FS.** Regional Changes in calcium underlying contraction of single smooth muscle cell, *Science*, 1987, Vol. 235, pp. 1644-1648.
219. **Williams, S. E., Brazier, S. P., Baban, N., Telezhkin, V., Muller, C. T., Riccardi, D., and Kemp, P. J.** A structural motif in the C-terminal tail of slo1 confers carbon monoxide sensitivity to human BK Ca channels. *Pflugers Arch.*, 2008, 456, 561–572.
220. **Williams, S. E., Wootton, P., Mason, H. S., Bould, J., Iles, D. E., Riccardi, D., Peers, C., and Kemp, P. J.** Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science*, 2004, 306, 2093–2097.
221. **Wu, L., Cao, K., Lu, Y., and Wang, R.** Different mechanisms underlying the stimulation of KCa channels by nitric oxide and carbon monoxide. *J. Clin. Invest.*, 2002, 110, 691–700.
222. **Wu, L. and Wang, R.** Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol. Rev.*, 2005, 57, 585–630.
223. **Xi, Q., Tcheranova, D., Parfenova, H., Horowitz, B., Leffler, C. W., and Jaggar, J. H.** Carbon monoxide activates KCa channels in newborn arteriole smooth muscle cells by increasing apparent Ca²⁺ sensitivity of alpha-subunits. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, 2004, 286, H610–H618.
224. **Xue L, Farrugia G, Miller SM, Ferris CD, Snyder SH, Szurszewski JH** Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Feb 15, 2000, Vol. 97, pp. 1851-1855.

225. **Zakhary R, Poss K.D., Jaffrey S.R., Ferris C.D., Tonegawa S., Snyder S.H.** Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide, : Proc Natl Acad Sci U S A., 1997, - Vol. 94, pp. 14848-53.
226. **Zhang F, Kaide JI, Rodriguez-Mulero F. et al.** Vasoregulatory function of the heme-heme oxygenase-carbon monoxide system. Am J Hypertens. 2001, Vol.14, pp. 62S-67S.
227. **Zhang X., Shan, P., Otterbein, L.E., Alam, J., Flavell, R.A., Davis, R.J., Choi, A.M. and Lee, P.J.** Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3, J Biol Chem, 2003, Vol. 278, pp. 1248-58.
228. **Zhuang JC, C. Lin, D. Lin, G.N. Wogan.** Mutagenesis associated with nitric oxide production in macrophages., Proc Natl Acad Sci USA, 1998, Vol. 95, pp. 8286–8291.