

# Наявність сульфгідрилвмісної речовини є необхідною умовою активації TRPV1 донорами оксиду азоту

Б.Р. Шаропов, Я.М. Шуба

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: sharopov@biph.kiev.ua

*Вперше продемонстровано активацію TRPV1 донором оксиду азоту (NO) при його зовнішньому прикладанні. Цього ефекту вдалося досягти завдяки аплікації нітропрусида натрію (НП-Na) при одночасній подачі сульфгідрилвмісної речовини L-цистеїну, що прискорювало вивільнення NO. Показано, що зовнішнє прикладання НП-Na per se до нейронів дорсальних корінцевих гангліїв (ДКГ), чутливих до агоніста TRPV1 капсаїцину, не здатне викликати активацію досліджуваного білка. Натомість додавання НП-Na одночасно з L-цистеїном призводило до виникнення трансмембранного струму з ознаками, що характерні для TRPV1-опосередкованого, а саме вихідного за умов мембранного командного потенціалу ( $V_{comm}$ ) +50 мВ, вхідного за умов  $V_{comm}$  -100 мВ і чутливого до блокування капсазепіном, селективним антагоністом цього іонного каналу. Водночас внесення лише L-цистеїну не викликало жодної відповіді. Таким чином, у цій роботі підтверджується припущення щодо чутливості TRPV1 до NO й пропонується простий метод для подальших досліджень їх взаємодії. Ключові слова: TRPV1; оксид азоту; донори NO; L-цистеїн; patch-clamp.*

## ВСТУП

Останніми роками значний інтерес дослідників викликає можливість прямого впливу оксиду азоту (NO) на активність різноманітних білків, у т.ч. іонних каналів [1, 2]. Оксид азоту, продукт класу ферментів NO-синтаз, в організмі відіграє роль ключової сигнальної молекули, що бере участь у регуляції судинного тонуусу, нейротрансмісії, пенільної та кліторальної ерекції, макрофагальної цитотоксичності тощо [3, 4]. Вважається, що сприймання клітиною NO-опосередкованих сигналів відбувається двома шляхами. По-перше, ензим гуанілатциклаза, що є найбільш канонічним рецептором NO, активується у відповідь на нековалентне зв'язування з цим агоністом через коферментний гем [5, 6]. По-друге, існує інший, відносно малодосліджений механізм детекції NO клітиною, а саме пряма модифікація протеїнів через нітрозилювання їхніх вільних SH-

груп на залишках цистеїну, що спричиняє конформаційні та функціональні зміни в білках [7]. Фізіологічна роль другого механізму лишається недостатньо з'ясованою, хоча показано, що спектр мішеней ковалентної модифікації NO є доволі широким і включає в себе структурні, метаболічні та сигнальні протеїни [2].

Однією з потенційних мішеней S-нітрозилювання, спричиненого NO, є іонний канал TRPV1 [8, 9]. Білок TRPV1, що належить до родини неселективних катіонних каналів TRP (від англ. *Transient Receptor Potential*), в останні десятиріччя найбільш інтенсивно досліджувався як молекулярний сенсор високих температур у ноцицептивному діапазоні (більше ніж 42° C) і фармакологічна мішень капсаїцину, активної речовини плодів червоного перцю роду *Capsicum* [10, 11]. Окрім терморецептивних аферентних нейронів, ген *TRPV1* також широко експресується в м'язовій, нервовій,

епітеліальній та інших тканинах [12], причому може локалізуватися на субклітинному рівні як на плазматичній мембрані (здебільшого в нейронах), так і на мембранах внутрішньоклітинних кальцієвих депо (здебільшого в міоцитах) [13-15]. Відповідно до різноманіття функцій, до яких залучений TRPV1, він є виключно полімодальним білком: до фізіологічних чинників його активації належать, окрім високої температури, деполяризація мембрани, низький рН, а також низка міжклітинних трансмітерів і вторинних посередників (наприклад, анандамід, N-арахідоноїлдопамін, деякі продукти ліпоксигенази тощо) [10, 11]. Окрім того, дослідницькими групами Miyamoto [9] та Yoshida [8] було отримано дані щодо можливої рецепції каналом TRPV1 оксиду азоту за допомогою ковалентного S-нітрозилювання в сайтах Cys616 і Cys621, що розташовані на цитозольному N-термінальному домені цього трансмембранного білка. Проте авторам не вдалося отримати макроскопічних TRPV1-опосередкованих струмів, викликаних прикладанням донорів NO. Натомість їхні висновки спиралися на дані, отримані методами кальциметрії та patch-clamp у конфігурації «поодинокий канал», що ставить під сумнів фізіологічну значущість ефектів, які ними спостерігалися.

Метою нашого дослідження було отримати інтегральний струм через іонні канали TRPV1 прикладанням оксиду азоту, прискорюючи вивільнення останнього з речовини-донора через коапlickацію сульфгідрилвмісної речовини L-цистеїну [16].

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 18 самцях-щурах лінії Вістар віком 3-4 міс. Тварин утримували у віварії Інституту фізіології ім. Богомольця НАНУ на стандартній лабораторній дієті й водогінній воді, забезпечених *ad libitum*. Усі процедури проводили відповідно до Директиви ЄС 2010/63/EU «Стосовно

захисту тварин, що використовуються у наукових цілях» і вказівок інститутського біотичного комітету. Тварин декапітували під ефірним наркозом. Виділені дорсальні корінцеві ганглії (ДКГ) негайно перфузували у охолоджену до 4° С безкальцієвому розчині Тіроде такого складу (ммоль/л): NaCl – 144, KCl – 5, декстроза – 5, HEPES – 10 (рН 7,4 осмолярність 313 мОсм), очищали від сполучної тканини й залишків нервів, після чого додатково різали на 2 – 4 частини кожен для кращого доступу протеолітичних ферментів. Гостроізолювані аферентні нейрони отримували обробкою ДКГ ензиматичною сумішшю з 1 мг/мл колагенази Ia та 2 мг/мл трипсину («Sigma», США) протягом 27 хв за 37° С з наступним піпетуванням; інкубацію проводили у стандартному розчині Тіроде, що містив (ммоль/л): NaCl – 135, KCl – 5, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 1, декстроза – 5, HEPES – 10 (рН 7,4, осмолярність 304 мОсм). Протеази відмивали двома циклами центрифугування за 200 г впродовж 4 хв з подальшою заміною перфузійного розчину. Нейрони ДКГ пасивно осаджували протягом 10 – 15 хв на круглій покривній скельця (діаметр 18 мм), зафіксовані у реєстраційній камері електрофізіологічної установки. Загальну клітинну суспензію зберігали за 4° С у відкритій пробірці Еппендорфа й брали в експеримент малими порціями впродовж 4 – 6 год після виділення.

Макроскопічні трансмембранні струми реєстрували за допомогою методу patch-clamp у конфігурації «ціла клітина». Піпетки з кінцевим опором 3 – 5 МОм і оплавленими кінчиками виготовляли з боросилікатних скляних капілярів («WPI», США) на пулері P-97 («Sutter Instrument», США). Внутрішній розчин складався з (ммоль/л): KCl – 20, K-глюконат – 108, EGTA – 8, CaCl<sub>2</sub> – 4, MgCl<sub>2</sub> – 1, Mg-АТФ – 1, HEPES – 10 (рН 7,4, осмолярність 287 мОсм). Компенсацію ємнісних транз'єнтів і до 80 % послідовного опору, генерування командного потенціалу ( $V_{comm}$ ) й реєстрацію струмів проводили за

допомогою підсилювача PC-ONE («Dagan Instruments», США) і програмного забезпечення pClamp 8.0 («Axon Instruments», США). Протягом експерименту нейрони перфузували за кімнатної температури (18 – 25° С) у стандартному розчині Тіроде, який також використовували для локальної аплікації таких фармакологічних агентів: 10 мкмоль/л капсаїцину (маточний розчин 25 мг/мл у 98 %-му етиловому спирті), 10 мкмоль/л капсазепіну (маточний розчин 10 ммоль/л у 98 %-му етиловому спирті), 100 мкмоль/л нітропрусиду натрію (НП-Na, готували *ex tempore*), 100 мкмоль/л L-цистеїну (готували *ex tempore*); всі речовини були фірми «Sigma» (США). Запис струмів проводили за протоколом типу «епізодична стимуляція» за стаціонарних значень  $V_{\text{comm}}$  фіксованих на +50 мВ і -100 мВ протягом 100 мс; окремі епізоди стимуляції були відокремлені відновними інтервалами тривалістю 2 с, за яких мембранний потенціал підтримували на -60 мВ. Результати обробляли за допомогою програмного забезпечення Origin 8.5.

## РЕЗУЛЬТАТИ

Аферентні соматосенсорні нейрони ДКГ розрізняються між собою за діаметром соми, товщиною і мієлінізацією периферичної терміналі, різноманітністю експресованих рецепторів та виконуваними функціями. Для реєстрації обирали клітини малого діаметра, які, згідно з даними літератури, здебільшого є термо- і ноцицепторами, що експресують TRPV1 [17]. Для остаточного підтвердження наявності на мембранах досліджуваних клітин цього іонного каналу був використаний його селективний агоніст капсаїцин (рис. 1) у концентрації насичення 10 мкмоль/л. При його аплікації в більшості з обраних для запису клітин спостерігалася виникнення струму, що за напрямом був вихідним при підтримуваному мембранному потенціалі ( $V_{\text{comm}}$ ) +50 мВ і вхідним при  $V_{\text{comm}}$  -100 мВ. Така форма відповіді є ознакою TRPV1-

опосередкованої провідності, оскільки цей іонний канал неселективно проникний для катіонів, через що його потенціал реверсії ( $V_{\text{rev}}$ ) знаходиться близько до 0 мВ. Амплітуда капсаїциніндукованого струму становила  $895 \pm 120$  пА за  $V_{\text{comm}}$  +50 мВ та  $-1306 \pm 37$  пА за  $V_{\text{comm}}$  -100 мВ, а його щільність  $+59 \pm 8$  та  $-73 \pm 14$  пА/пФ, відповідно. Оскільки протягом 20 с, впродовж яких тривало локальне прикладання агоніста, не спостерігали жодного зниження струму в зв'язку з десинситизацією, ці самі клітини використовували для подальших експериментальних процедур.

При аплікації донора NO НП-Na спостерігали виникнення вихідного струму за  $V_{\text{comm}}$  +50 мВ, хоча жодної його зміни за  $V_{\text{comm}}$  -100 мВ не відбувалося взагалі або ж вона була незначною (рис. 2). Цей ефект може бути пояснений тим, що НП-Na при вивільненні ним NO спричинював відкриття неідентифікованого іонного каналу з сильним вхідним випрямленням (наприклад, калієвого каналу великої провідності з родини BK, який також активується NO [18, 19]), через що дія донора спостерігалася лише за позитивних значень  $V_{\text{comm}}$ . Водночас відкриванням іонного каналу TRPV1 цей ефект не може бути пояснений, що впливає з форми типової для нього вольт-амперної (I-V) характеристики [13]. Натомість аплікація НП-Na одночасно з

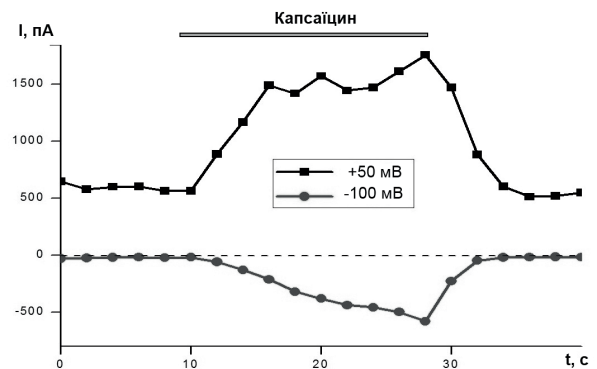


Рис. 1. Активізація іонного каналу TRPV1 його селективним агоністом капсаїцином (10 мкмоль/л, репрезентативний запис, n=17)

тіоловим субстратом L-цистеїном викликала появу струмів такої самої форми, як і при дії селективного агоніста TRPV1 капсаїцину (рис. 3), тобто вихідних за позитивних значень  $V_{\text{comm}}$  і вхідних – за негативних. Варто зазначити, що швидкість потоку при паралельній аплікації НП-Na і L-цистеїну була ретельно відрегульована таким чином, щоб не перевищувати такої при прикладанні чистого розчину Тіроде чи капсаїцину, аби уникнути виникнення артефактів від можливого відкривання механочутливих іонних каналів, наприклад, Piezo або TRPV4 [20]. Амплітуда струму, індукованого сумішшю НП-Na та L-цистеїну, становила  $203 \pm 35$  пА за  $V_{\text{comm}} +50$  мВ та  $-271 \pm 42$  пА  $V_{\text{comm}} -100$  мВ, а його щільність була  $13 \pm 3$  та  $18 \pm 4$  пА/пФ відповідно. Аплікація лише самого L-цистеїну не викликала жодної зміни мембранної провідності (результати не представлено). Для того, аби підтвердити тотожність NO-індукованого струму, що спостерігався при прикладанні суміші НП-Na і L-цистеїну, з TRPV1-опосередкованим, було застосовано селективний антагоніст TRPV1 капсазепін. На початку його дії на фоні суміші НП-Na та L-цистеїну спостерігалось зниження викликаного ними струму (рис. 4). Це доводить, що струм, який виникав при аплікації НП-Na та L-цистеїну, був опосередкований саме TRPV1.

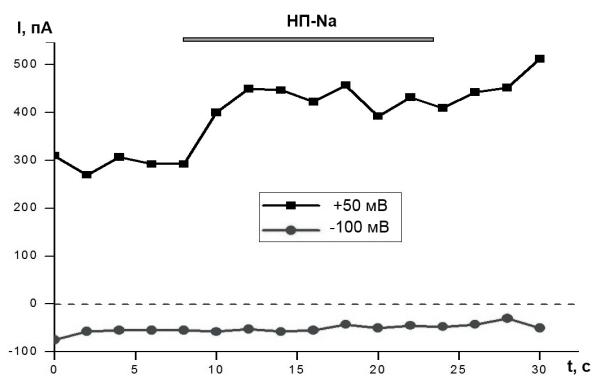


Рис. 2. Відсутність ефекту на іонний канал TRPV1 при аплікації *per se* 100 мкмоль/л донора оксиду азоту нітропрусида натрію (НП-Na) (репрезентативний запис, n=8)

## ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Наше дослідження було присвячене пошуку експериментальних умов, за яких стає можливо, використовуючи донори NO, індукувати макроскопічний TRPV1-опосередкований струм. Принципова можливість активації TRPV1 оксидом азоту за механізмом ковалентного S-нітрозилування була показана раніше методами кальциметрії та patch-clamp в конфігурації «поодинокий канал» [9, 21]. Втім, таким традиційним для електрофізіології шляхом, як демонстрування макроскопічної мембранної провідності при зовнішній аплікації агоніста, відкривання каналу в зазначених працях досягти не вдалося. Miyamoto із співавт. [9] намагалися пояснити це тим, що NO, виділяючись із речовини-донора в позаклітинному середовищі, нездатен подолати плазматичну мембрану, аби дістатися до сайтів взаємодії з протейном TRPV1, що знаходяться на цитозольному N-кінцевому домені білка в позиціях Cys616 і Cys621. Однак, на нашу думку, таке пояснення є незадовільним, оскільки в декількох інших дослідженнях була продемонстрована проникність біліпідних мембран як для NO, так і для його найчастіше вживаного донора S-нітрузо-N-ацетилпеніциламіну (SNAP), особливо за умови наявності в цих мембранах холестерину [22, 23].

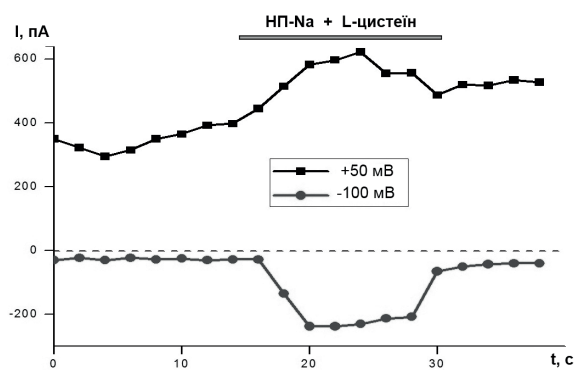


Рис. 3. Активация іонного каналу TRPV1 при одночасній дії 100 мкмоль/л нітропрусида натрію (НП-Na) та 100 мкмоль/л сульфгідрилвмісного реагента L-цистеїну (репрезентативний запис, n=6)

Натомість ми припустили, що невдачі при спробах викликати TRPV1-опосередкований струм через зовнішню аплікацію речовин-донорів пов'язані з малою інтенсивністю спонтанного вивільнення NO з останніх саме в експериментах на поодиноких клітинах. Безперечно, такі донори оксиду азоту, як НП-Na, нітрогліцерин і SNAP, показали себе ефективними джерелами цього газового трансмітера в експериментах *in vivo* (при системному введенні живій тварині) або в дослідях на ізольованих органах. Водночас вважалось, що вивільнення цими речовинами NO є цілковито спонтанним і може з такою самою інтенсивністю відбуватись в їхніх розчинах *per se*, тим паче що цей процес каталізується світлом [24]. Проте було також показано, що виділення NO може значно прискорюватися у разі взаємодії молекул донора з такими сульфгідрилвмісними речовинами, як L-цистеїн або глутатіон, котрі наявні в значній кількості в живих клітинах.

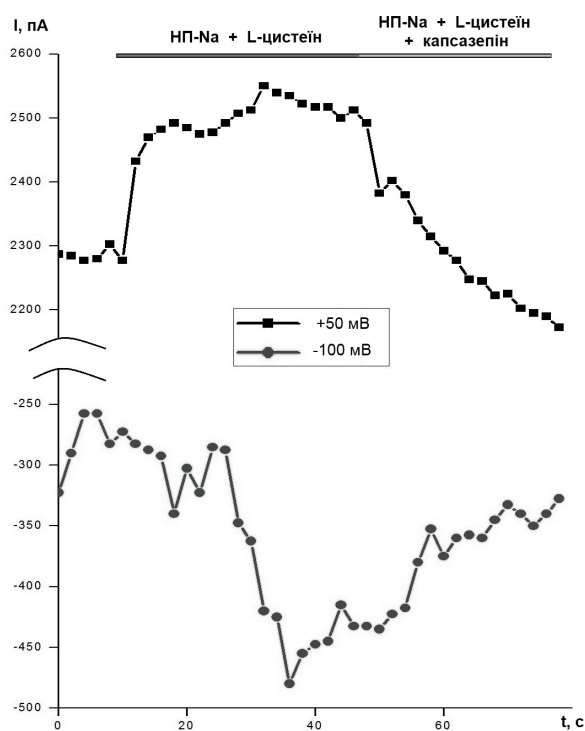


Рис. 4. Блокування NO-індукованого TRPV1-опосередкованого струму селективним антагоністом цього іонного каналу капсазепіном (репрезентативний запис,  $n=3$ )

Зокрема, згідно з даними літератури, повне проходження реакції розкладання найчастіше використовуваних донорів з вивільненням оксиду азоту в розчині відбувається за декілька діб, водночас за наявності L-цистеїну або глутатіону цей час скорочується до 30 хв [16, 25]. Таким чином, ефективність речовин-донорів NO в дослідях на багатоклітинних препаратах може бути пов'язана з тим, що їхній розпад пришвидшується взаємодією з біогенними L-цистеїном і глутатіоном, у той час як в електрофізіологічних експериментах, які зазвичай проводять на поодиноких ізольованих клітинах, кількість сульфгідрилвмісних сполук є недостатньою для помітного пришвидшення зазначеної реакції. Згідно з нашими результатами, це можливо виправити, забезпечивши таке екзогенне джерело тіолових груп, як L-цистеїн. Ймовірно, для цього також можуть бути використані й інші поширені в лабораторіях тіолові реактиви, наприклад, глутатіон та дитіотреїтол.

Ключовим питанням у межах проблематики рецепції TRPV1 оксиду азоту лишається те, чи є його концентрації, що продукується в організмі (від 2 до 2000 нмоль/л), достатніми для активації значущої кількості іонних каналів TRPV1 [26]. Газові трансмітери, на відміну від традиційних фармакологічних агентів, не можуть бути використані в досліді самі по собі через свою леткість, натомість мають доставлятися до молекул-мішеней у вигляді сполук-донорів [27]. Це, в свою чергу, спричиняє нестабільність і невизначеність щодо дійсної робочої концентрації NO в досліді, якої вдається досягти за конкретного експериментального протоколу, позаяк реакція розпаду донора може залежати від температури, складу перфузійного розчину, наявності світла, тривалості експерименту та типу досліджуваного біологічного матеріалу [28]. Отже, для з'ясування фізіологічної релевантності активації TRPV1 оксидом азоту з застосуванням запропонованого нами методичного підходу слід встановити, яка саме кількість NO виділяється при взаємодії

його донорів із сульфгідрилвмісними реагентами, і порівняти її з відповідними результатами досліджень *in vivo*.

Таким чином, наші результати підтверджують дані інших авторів щодо можливої ролі іонного каналу TRPV1 як рецептора оксиду азоту. Запропонована нами методика одночасної аплікації донорів NO із сульфгідрилвмісними речовинами під час електрофізіологічного експерименту дає змогу значно спростити подальші дослідження з вивчення ролі оксиду азоту як фізіологічного активатора TRPV1.

**Б.Р. Шаропов, Я.М. Шуба**

### **НАЛИЧИЕ СУЛЬФИДРИЛ-СОДЕРЖАЩЕГО ВЕЩЕСТВА ЯВЛЯЕТСЯ НЕОБХОДИМЫМ УСЛОВИЕМ АКТИВАЦИИ TRPV1 ДОНОРАМИ ОКСИДА АЗОТА**

Впервые продемонстрирована активация TRPV1 донором оксида азота (NO) при внешнем приложении последнего. Этого эффекта удалось добиться благодаря одновременной подаче сульфидрилсодержащего вещества L-цистеина вместе с аппликацией донора NO нитропруссидом натрия (НП-Na), что ускоряло высвобождение NO. Показано, что внешнее приложение НП-Na *per se* к нейронам дорсальных корешковых ганглиев (ДКГ), отвечающих на аппликацию капсаицина, неспособно вызвать активацию этого ионного канала. Напротив приложение НП-Na одновременно с L-цистеином приводит к возникновению трансмембранного тока с признаками, характерными для TRPV1-опосредованного, а именно выходящего при командном мембранном потенциале ( $V_{\text{comm}}$ ) +50 мВ, входящего при  $V_{\text{comm}}$  -100 мВ и блокирующегося капсазепином, селективным блокатором данного ионного канала. В то же время аппликация самого по себе L-цистеина не вызывала никакого ответа в данных условиях. Таким образом, предлагаемая работа подтверждает предположение о чувствительности TRPV1 к активации оксидом азота и предлагает простой метод для дальнейших исследований их взаимодействия.

Ключевые слова: TRPV1; оксид азота; доноры NO; L-цистеин; patch-clamp.

**B.R. Sharopov, Y.M. Shuba**

### **ACTIVATION OF TRPV1 BY NITRIC OXIDE DONORS REQUIRES CO-APPLICATION OF SULFHYDRIL-CONTAINING REAGENT**

Previous studies suggested that polymodal capsaicin-sensitive

TRPV1 ion channel could also be a receptor for nitric oxide (NO). However, the evidence for this notion is based on rather indirect experiments, which questions its physiological relevance. The present paper provides an improved method of application of NO donors such as sodium nitroprusside (SNP) in an electrophysiological experiment, implying the simultaneous delivery of sulfhydryl-containing reagents such as L-cysteine (L-Cys) that facilitates the release of NO from a donor substance and allows inducing macroscopic TRPV1-mediated current. We found that external application of 100  $\mu\text{M}$  SNP *per se* onto dorsal root ganglia (DRG) neurons responsive to capsaicin cannot activate TRPV1 ion channel. In contrast, the application of SNP simultaneously with 100  $\mu\text{M}$  L-Cys induces transmembrane current with features characteristic of TRPV1-mediated one, i.e., inward at command membrane potential ( $V_{\text{comm}}$ ) +50 mV, outward at  $V_{\text{comm}}$  -100 mV, and susceptible to blockade with capsazepine, a selective TRPV1 antagonist. At the same time, the application of L-Cys itself evoked no response in conditions tested. To summarize, our work confirms the assumption about the sensitivity of TRPV1 to NO and provides a simple method for further studies of their interaction.

Key words: TRPV1; nitric oxide; NO donors; L-cysteine; patch clamp

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

### **REFERENCES**

1. Ahern GP, Klyachko VA, Jackson MB. cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 510-7.
2. Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 193-7.
3. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem.* 1994; 63: 175-95.
4. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994; 78: 915-8.
5. Russwurm M, Koesling D. NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J.* 2004; 23: 4443-50.
6. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev.* 2010; 62: 525-63.
7. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 150-66.
8. Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, et al. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol.* 2006; 2: 596-607.
9. Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One.* 2009; 4: e7596.
10. Pingle SC, Matta JA, Ahern GP. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb Exp*

- Pharmacol. 2007; 155-71.
11. Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6: 357-72.
  12. Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol.* 2012; 166: 510-21.
  13. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997; 389: 816-24.
  14. Lotteau S, Ducreux S, Romestaing C, Legrand C, Van Coppenolle F. Characterization of functional TRPV1 channels in the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *PLoS One.* 2013; 8: e58673.
  15. Lu MJ, Chen YS, Huang HS, Ma MC. Hypoxic preconditioning protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via the arachidonate 12-lipoxygenase/transient receptor potential vanilloid 1 pathway. *Basic Res Cardiol.* 2014; 109: 414.
  16. Grossi L, D'Angelo S. Sodium nitroprusside: mechanism of NO release mediated by sulfhydryl-containing molecules. *J Med Chem.* 2005; 48: 2622-6.
  17. Lallemand F, Ernfors P. Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci.* 2012; 35: 373-81.
  18. Mistry DK, Garland CJ. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1998; 124: 1131-40.
  19. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994; 368: 850-3.
  20. Delmas P, Hao J, Rodat-Despoix L. Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nat Rev Neurosci.* 2011; 12: 139-53.
  21. Yoshimura N, Ogawa T, Miyazato M, Kitta T, Furuta A, Chancellor MB, et al. Neural mechanisms underlying lower urinary tract dysfunction. *Korean J Urol.* 2014; 55: 81-90.
  22. Subczynski WK, Lomnicka M, Hyde JS. Permeability of nitric oxide through lipid bilayer membranes. *Free Radic Res.* 1996; 24: 343-9.
  23. Nedeianu S, Pali T, Marsh D. Membrane penetration of nitric oxide and its donor S-nitroso-N-acetylpenicillamine: a spin-label electron paramagnetic resonance spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1661: 135-43.
  24. Shishido SM, Ganzarolli de Oliveira M. Photosensitivity of aqueous sodium nitroprusside solutions: nitric oxide release versus cyanide toxicity. *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism.* 2001; 26: 239-61.
  25. Bradley SA, Steinert JR. Characterisation and comparison of temporal release profiles of nitric oxide generating donors. *J Neurosci Methods.* 2015; 245: 116-24.
  26. Hall CN, Garthwaite J. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide.* 2009; 21: 92-103.
  27. Wang PG, Xian M, Tang X, Wu X, Wen Z, Cai T, et al. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem Rev.* 2002; 102: 1091-134.
  28. Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol.* 2007; 151: 305-21.

*Матеріал надійшов  
до редакції 19.10.206*