

УДК 612.73/33:611.348:57.085.21

ВЛИЯНИЕ ГАЗОТРАНСМИТТЕРА ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА НАТРИЯ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ И СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТИ ГЛАДКИХ МЫШЦ *TENIA COLI* МОРСКОЙ СВИНКИО.И. Антонов, В.Б. Студницкий, Ю.А. Погудин,
А.В. Скворцов, М.А. МедведевСибирский государственный медицинский университет,
г. Томск
E-mail: nphys@yandex.ru**Антонов Олег Иванович**, ассистент кафедры нормальной физиологии СибГМУ, г. Томск.
E-mail: oleg-antonov@yandex.ru

Область научных интересов: физиология, физиология желудочно-кишечного тракта, электрофизиология гладких мышц.

Студницкий Василий Борисович, кандидат биологических наук, доцент кафедры нормальной физиологии.

СибГМУ, г. Томск.

E-mail: nphys@yandex.ru

Область научных интересов: физиология, физиология желудочно-кишечного тракта, электрофизиология гладких мышц.

Погудин Юрий Анатольевич, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры нормальной физиологии СибГМУ, г. Томск.

E-mail: pogudinyu@vtomske.ru

Область научных интересов: физиология, физиология желудочно-кишечного тракта, электрофизиология гладких мышц.

Скворцов Алексей Владимирович, аспирант кафедры нормальной физиологии СибГМУ, г. Томск.

E-mail: skvorec347680@mail.ru

Область научных интересов: физиология, физиология желудочно-кишечного тракта, электрофизиология гладких мышц.

Медведев Михаил Андреевич, заведующий кафедрой нормальной физиологии, доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ.

E-mail: medvedev@ssmu.ru

Область научных интересов: физиология, репродуктивная деятельность, возбудимость тканей, внутриклеточная сигнализация, вторичные посредники, цитоскелет, окислительный стресс, апоптоз.

Методом двойного «сахарозного мостика» было изучено влияние гидроген сульфида (NaHS) на гладкомышечные клетки (ГМК) *taenia coli* морской свинки. NaHS приводил к подавлению параметров вызванной электрической и сократительной активности, что сопровождалось развитием гиперполяризации и снижением сопротивления мембраны. Этот эффект предотвращается известным блокатором калиевых каналов тетраэтиламмонием (ТЭА).

Ключевые слова:Гидроген сульфид, тетраэтиламмоний, двойной «сахарозный мостик», гладкие мышцы, *taenia coli*.

В настоящее время гидроген сульфид (H_2S) наряду с NO и CO признан новым газовым посредником, который вовлекается в регуляцию функций в тканях млекопитающих [7]. H_2S – зловонный и токсичный газ. Его токсичность связана с тем, что он является потенциальным реверсивным ингибитором цитохром С оксидазы на конце электронной транспортной цепи митохондрий. В воде и плазме крови он ведет себя как слабая кислота и диссоциирует следующим образом: $H_2S \rightarrow HS^- + H^+$. pK_{a1} при 37 °C составляет 6,76; следовательно, когда NaHS или H_2S растворяют в растворе Кребса, который забуферивается при pH 7,4 и 37 °C, то образуется 18,5%-й H_2S и 81,5%-й HS^- (и еще след S^{2-} ; $pK_{a2} = 11,96$), согласно уравнению Хендерсон–Хассельбаха [7, 9].

Эндогенно сероводород синтезируется ферментативным (рис. 1, а) и неферментативными (рис. 1, б) путями. Субстратом для ферментативного синтеза сероводорода является серосодержащая аминокислота L-цистеин, которая под действием пиродоксаль-5-фосфатзависимых энзимов, включая цистотионин-β-синтазу (CBS) и цистотионин-β-лиазу (CSE), служит источником наработки H_2S . Она может поступать в организм с пищей, образовываться в результате распада белков и синтезироваться из L-метионина в процессе транссульфирования, где промежуточным продуктом является гомоцистеин. Эндогенно-энзимотическая продукция H_2S в тканях млекопитающих освещена в ряде работ [3, 10, 14].

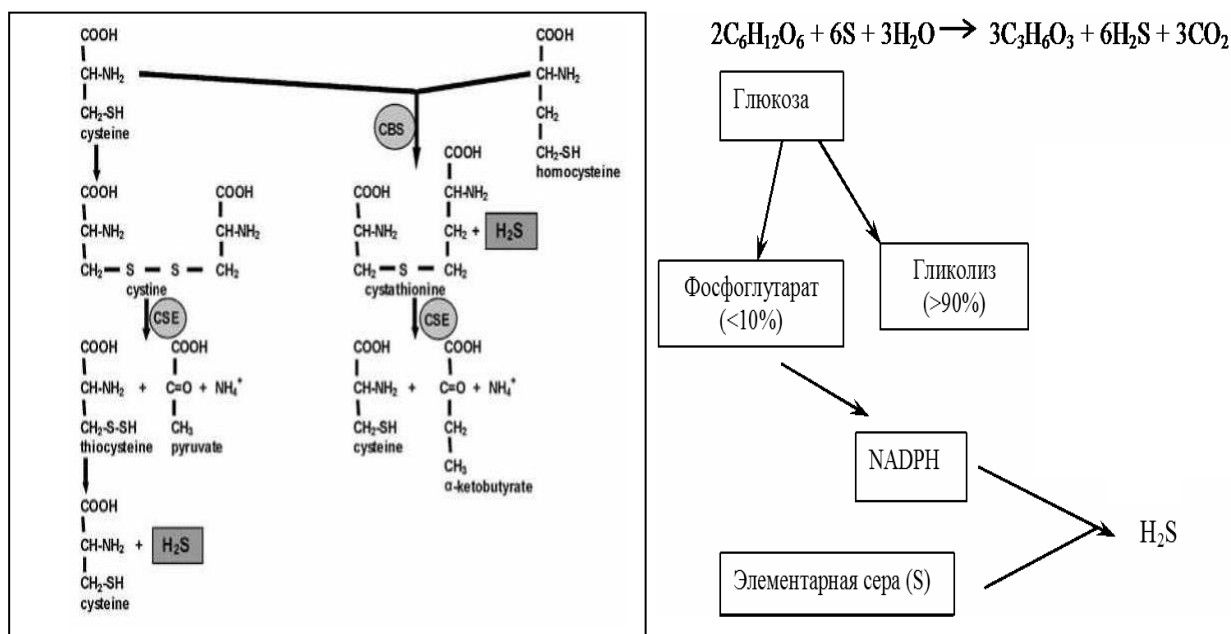


Рис. 1. а – ферментативный путь образования гидроген сульфида [Lowicka, Beltowski, 2007]; CDO – цистатионин диоксигеназа, SO – сульфидоксигеназа, CSE – цистатионин γ -лиаза, CBS – цистатионин β -синтаза; б – неферментативный путь синтеза сероводорода [Wang 2002]

С помощью фермента CBS из гомоцистеина и цистеина образуется цистатионин с образованием гидроген сульфида. С помощью фермента CSE происходит превращение цистеина в тиоцистин и пируват. Тиоцистин далее превращается в цистеин с образованием сероводорода.

Другим, менее важным источником сероводорода является неферментативное восстановление серы в сероводород во время окисления глюкозы. Все существенные компоненты этого неферментативного пути в норме присутствуют в естественных условиях, включая поставку серы.

Ряд полученных экспериментальных данных свидетельствует о том, что H_2S в качестве посредника может обеспечивать не только локальную, но и дистантную регуляцию в различных гладкомышечных образованиях [5].

В гладкой мышце млекопитающих H_2S от 0,025 до 0,1 ммоль \cdot л $^{-1}$ вызывает концентрационно-зависимое расслабление в аорте, подвздошной кишке, портальной вене и vas deferens и влечет за собой снижение спонтанной сократимости в матке [4, 10, 12, 13, 15].

Сердечно-сосудистые эффекты H_2S у млекопитающих заключаются в снижении кровяного давления, подобно действию NO. По крайней мере, некоторые эффекты действия H_2S на гладкие мышцы сосудов опосредуются через прямую активацию АТФ-чувствительных K^+ каналов [16, 18]. С другой стороны, H_2S -опосредованная вазорелаксация может вовлекать не-АТФ-ассоциированную повышенную проводимость АТФ-чувствительных K^+ каналов. Кроме этого, сосудистые эффекты H_2S не снижаются блокадой NO / растворимая гуанилат циклаза пути регуляции, показывая, что H_2S -опосредованная вазорелаксация оперирует независимо от цГМФ-образования.

Потенциальными вазоактивными механизмами, которые могут являться O_2 -зависимыми, включают в себя H_2S -взаимодействие с гем-белками, такими как циклооксигеназа, а также образование продуктов сульфидного окисления, например сульфита и тиосульфата. В аорте крысы физиологические концентрации H_2S опосредуют либо сокращение, либо расслабление в зависимости от напряжения O_2 [6]. В сердечной мышце млекопитающих H_2S снижает сократимость in vivo и in vitro, оказывая прямое ингибирующее действие на L-тип кальциевых каналов кардиомиоцитов [11].

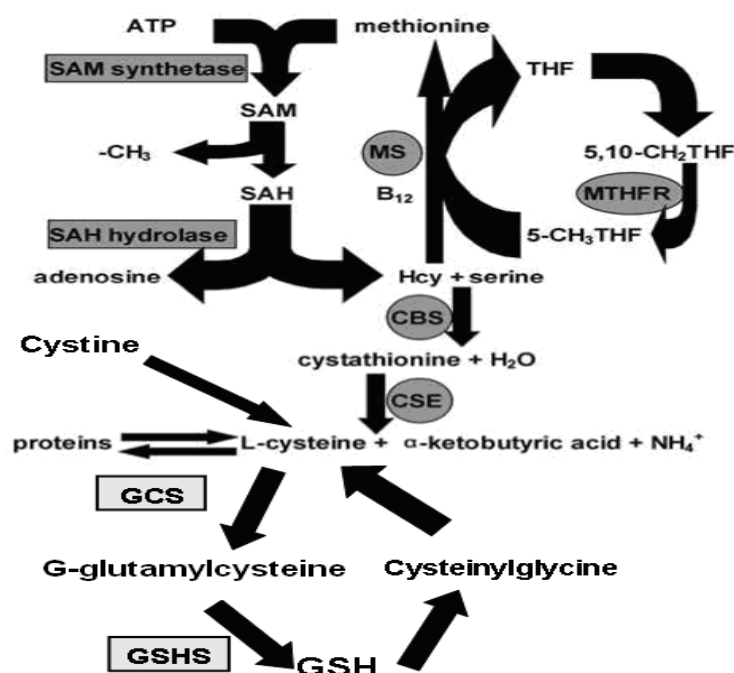


Рис. 2. Синтез цистеина [Lowicka, Beltowski, 2007]: GSH – глутатион; GSXS – глутатион синтетазы; GCS – γ -глутамилцистеин синтетазы; SAH – S-аденозилгомоцистеин; SAM – S-аденозилметионин; MS – метионин-синтаза; 5-CH₃THF – 5-метилтетрагидрофолат; 5,10-CH₂THF – 5,10-метилентетрагидрофолат; MTHFR – метилентетрагидрофолат редуктаза; CBS – цистатионин b-синтаза; CSE – цистатионин g-лиаза; Hcy – гомоцистеин

В отношении гладких мышц желудочно-кишечного тракта имеющиеся литературные данные не дают однозначного представления о механизме действия H₂S. В этой связи возникает необходимость изучения основных закономерностей и особенностей реализации сигнальной функции H₂S в гладкомышечных образованиях пищеварительного тракта.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния различных концентраций гидроген сульфида на показатели электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток *taenia coli* морской свинки.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись гладкомышечные препараты (ГП) *taenia coli* морских свинок (массой 500–700 гр.) шириной 0,5–0,7 мм и длиной 10–12 мм. Исследование электрофизиологических свойств гладких мышц проводили методом двойного «сахарозного мостика» в модификации Артеменко и Шубы, который позволял одновременно регистрировать электрическую и сократительную активность [1]. Нормальный раствор Кребса, который использовался в опытах, имел следующий состав (мМ): NaCl – 120,4; KCL – 5,9; NaHCO₃ – 15,5; NaH₂PO₄ – 1,2; CaCl₂ – 2,5; глюкоза – 11,5.

В качестве экзогенного донора H₂S использовался гидросульфид натрия (NaHS), который в водном растворе диссоциирует на H₂S⁻ и Na⁺, а затем H₂S⁻ реагирует с H₂O и образует H₂S газ в концентрации 1/3 от молярной концентрации NaHS [3].

Кислотность растворов поддерживали в пределах 7,35–7,40, температуру – в диапазоне 36,5–37,0 °С. При данной кислотности и температуре 18,5%-й HS⁻ аниона комбинируется с H⁺, формируя H₂S [7]. Эта реакция значительно не изменяет значение pH в забуференном растворе Кребса даже при наибольших используемых концентрациях NaSH.

Полученные экспериментальные данные обчитывались и выражались как в абсолютных единицах, так и в процентах по отношению к исходным показателям.

Результаты исследований

В нормальном растворе Кребса полоски *taenia coli* морской свинки, как правило, обладали спонтанной электрической активностью, генерируя сложные потенциалы действия, состоящие из медленной волны, на гребне которой возникали пиковые потенциалы действия. Каждый такой электрический комплекс сопровождался сократительным ответом. Действие поляризующих прямоугольных импульсов электрического тока различной полярности сопровождалось развитием электротонических потенциалов. Гиперполяризующие импульсы тока приводили к формированию анэлектротонических потенциалов, по величине которых оценивалось сопротивление мембраны. Они характеризовались расслаблением ГМ-полосок, величина которых зависела от силы тока. Действие деполяризующих импульсов тока приводило к генерации одного или нескольких потенциалов действия на плато катэлектротонических потенциалов и развитию фазного сокращения (рис. 3).

Применение гидроген сульфида натрия (NaHS) в концентрации от 10^{-6} до 10^{-5} М не оказывало существенного влияния на параметры электрической и сократительной активности ГМК *taenia coli*.

В концентрации 10^{-4} М NaHS вызывал подавление спонтанной электрической и сократительной активности, гиперполяризацию мембраны величиной 0,3–0,5 мВ и снижение величины сопротивления мембраны на $13,6 \pm 2,3$ % ($n=6$, $p>0,05$), сила вызванных сокращений уменьшалась на $11,6 \pm 1,4$ % ($n=6$, $p>0,05$). Одновременно с этим снижался тонус гладкомышечных препаратов. По мере действия препарата происходило постепенное восстановление величины мембранного потенциала, сопротивления мембраны, восстановление возбудимости и силы вызванных сокращений до исходных значений в нормальном растворе Кребса к 6–7 мин.

В концентрации 10^{-3} М гидроген сульфид натрия гиперполяризовал мембрану на 0,8–0,9 мВ, снижал сопротивление на $24,3 \pm 1,7$ % ($n=6$, $p<0,05$), а сила вызванных сокращений уменьшалась на $42,7 \pm 2,3$ % ($n=6$, $p<0,05$) от исходных значений в нормальном растворе Кребса. Данный эффект сохранялся в течение 10–12 мин.

В концентрации $4 \cdot 10^{-3}$ М NaHS вызывал гиперполяризацию мембраны величиной 1,2–1,3 мВ, снижение сопротивления мембраны на $32,6 \pm 1,2$ % ($n=6$, $p<0,05$) и полное подавление вызванной электрической и сократительной активности. Данный эффект сохранялся в течение 12–13 мин. Окончание действия характеризовалось восстановлением величины мембранного потенциала и сопротивления, восстановлением вызванной и спонтанной электрической и сократительной активности ГП *taenia coli* (рис. 3).

Для изучения роли калиевой проводимости мембраны ГМК в эффектах NaHS использовался тетраэтиламмония (ТЭА), известный блокатор калиевых каналов, в концентрации 10^{-2} М. Считается, что в данной концентрации он вызывает ингибирование не только потенциал-зависимых калиевых каналов, но и кальций-активируемых калиевых каналов [5].

Действие ТЭА характеризовалось гиперполяризацией мембраны ГМК, увеличением сопротивления, повышением параметров спонтанной и вызванной электрической и сократительной активности. На этом фоне NaHS в концентрации $4 \cdot 10^{-3}$ М вызывал гиперполяризацию мембраны на 0,4–0,5 мВ, снижение сопротивления на $15,6 \pm 1,2$ % ($n=6$, $p<0,05$), а сила вызванных сокращений снижалась на $17,7 \pm 1,4$ % ($n=6$, $p<0,05$).

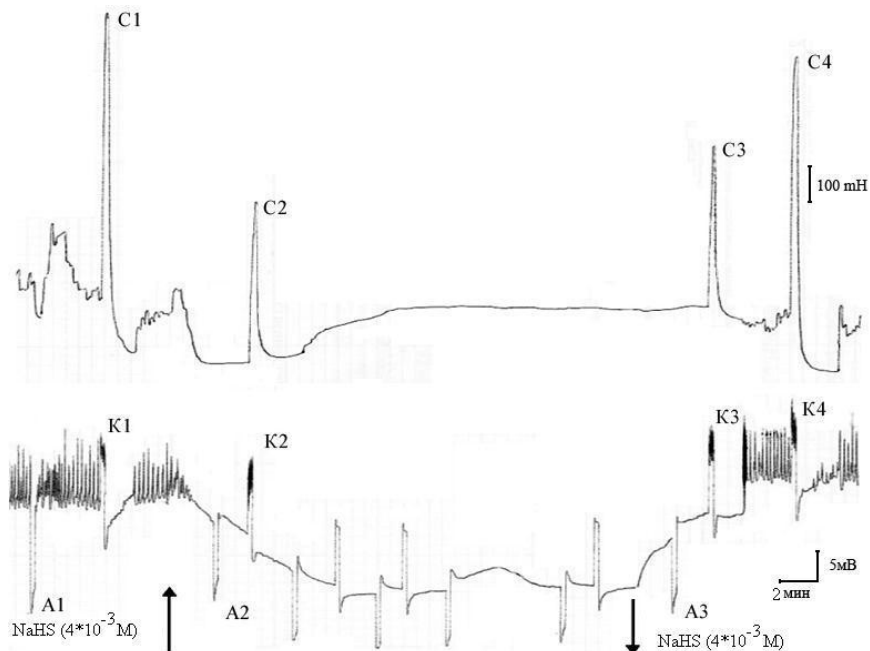


Рис. 3. Влияние гидрогенсульфида натрия ($4 \cdot 10^{-3}$ М) на электрические и сократительные свойства гладких мышц *t. coli* морской свинки. Регистрация записи проводилась на самопишущем потенциометре КСП-4. Здесь и далее А1–А3 – анэлектротонические потенциалы; К1–К4 – катэлектротонические потенциалы; С1–С4 – сокращение; нижняя кривая – электрическая, верхняя – сократительная активность

Данный эффект был кратковременным (3–4 мин.), в дальнейшем происходило восстановление до исходных значений вплоть до появления анодоразмыкательных ответов и спонтанной электрической и сократительной активности (рис. 4).

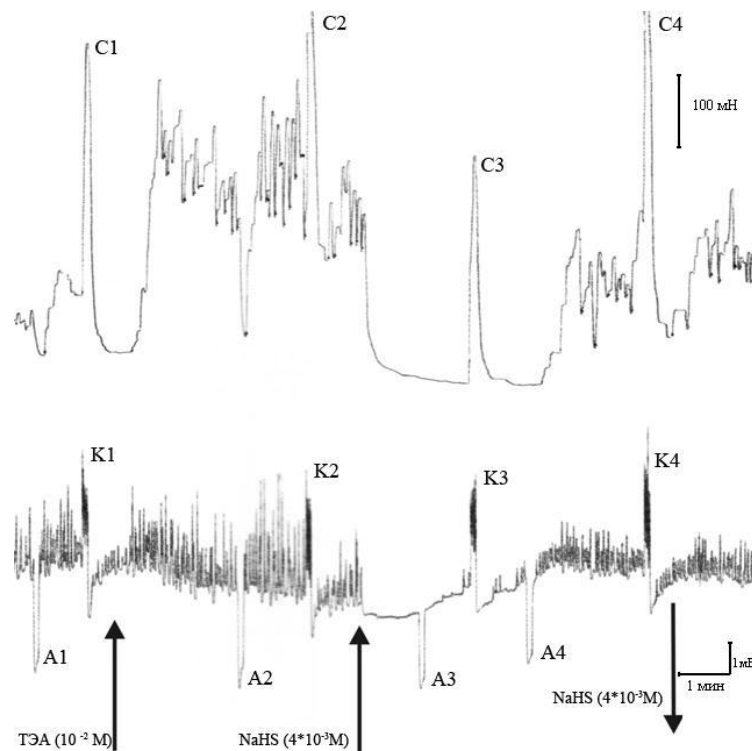


Рис. 4. Влияние гидрогенсульфида натрия ($4 \cdot 10^{-3}$ М) на электрические и сократительные свойства гладких мышц *t. coli* морской свинки на фоне действия тетраэтиламмония (10^{-2} М)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что гидроген сульфид приводит к подавлению параметров спонтанной и вызванной электрической и сократительной активности гладкомышечных клеток *taenia coli* морских свинок, что сопровождается развитием гиперполяризации и снижением сопротивления мембраны. Этот эффект существенно предотвращается ТЭА, известным блокатором калиевой проводимости мембраны гладкомышечных клеток. По всей вероятности, эффекты гидроген сульфида опосредуются не только через АТФ-зависимые калиевые каналы, подобно ГМК сосудов, но и через активацию потенциал-зависимых калиевых каналов и кальций-активируемых калиевых каналов, что требует дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Artemenko D.M., Shuba M.F. Metodika doslezhenija elektricheskikh elastivostej nervnyh tam, jazovih volokon za dopomogoju poverhnev pozaklitinnih elektrodiv // *Fiziol. zhurnal AN USSR*. – 1964. – Т. 10. – № 3. – С. 403–407.
2. M.Y. Ali, C.Y. Ping, L. Ling, M. Whiteman, M. Bhatia, P.K. Moore. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo: a new role for endogenous hydrogen sulfide // *British Journal of Pharmacology*. – 2006. – V. 149. – P. 625–634.
3. Abe, K., and H. Kimura. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator // *J. Neurosci*. – 1996. – V. 16 (3). – P. 1066–1071.
4. R.A. Dombkowski, M.J. Russel, K.R. Olson. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. – 2004. – V. 286. – P. 678–685.
5. Farrugia G, Irons WA, Rae JL, Sarr MG, Szurszewski JH. Activation of whole cell currents in isolated human jejunal circular smooth muscle cells by carbon monoxide // *Am J Physiol*. Jun – 1993. – V. 264(6 Pt 1). – G 1184–1189.
6. Jeffrey R. Koenitzer, T. Scott Isbell, Hetal D. Patel, Gloria A. Benavides, Dale A. Dickinson, Rakesh P. Patel, Victor M. Darley-Usmar, Jack R. Lancaster, Jr, Jeannette E. Doeller, and David W. Kraus. Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O₂-dependent manner // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2007. – V. 292. – P. 1953–1960.
7. Charles W. Leffler, Helena Parfenova, J.H. Jaggar, Rui. Wang Carbon monoxide and hydrogen sulfide: Gaseous messengers in cerebrovascular circulation // *J Appl Physiol*. – 2006. – V. 100. – P. 1065–1076.
8. Shiau Wei Lee, Yvonne Cheng, Philip K. Moore, Jin-Song Bian. Hydrogen sulfide regulates intracellular pH in vascular muscle cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2007. – V. 358. – P. 1142–1147.
9. Lawrence J. Henderson. Concerning the relationship between the strength of acids and their capacity to preserve neutrality // *Am. J. Physiol*. – 1908. – V.21 (4). – P. 173–179.
10. Hosoki R., N. Matsuki, and H. Kimura. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 1997. – V. 237. – P. 527–531.
11. Ying-Gang Sun, Yin-Xiang Cao, Wen-Wei Wang, Shan-Feng Ma, Tai Yao and Yi-Chun Zhu. Hydrogen sulfide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes // *Cardiovasc Res*. – 2008. – V. 79(4). – P. 632–641.
12. Sidhu R., Singh M., Samir G. and Carson R.J. L-cysteine and sodium hydrosulphide inhibit spontaneous contractility in isolated pregnant rat uterine strips in vitro // *Pharmacol. Toxicol*. – 2001. – V. 88. – P. 198–203.
13. Teague B., Asiedu S. and Moore P.K.. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility // *Br. J. Pharmacol*. – 2002. – V. 137. – P. 11–20.
14. George D. Webb, Lay Har Lim, Vernon M. S. Oh, Soh Bee Yeo. Contractile and Vasorelaxant Effects of Hydrogen Sulfide and Its Biosynthesis in the Human Internal Mammary Artery // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2008. – V. 324. – P. 876–882.

15. Zhao W., J. Zhang, Y. Lu and R. Wang. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener // *The EMBO Journal*. – 2001. – V. 20. – P. 6008–6016.
16. Zhao W., and R. Wang H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – V. 283. – P. 474–480.
17. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous K_{ATP} channel opener // *The EMBO Journal*. – 2001. – V. 20. – P. 6008–6016.
18. Zhao W., Wang R. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2002. – V. 283. – P. 474–480.

Поступила 20.12.2015 г.