

Смаглий Людмила Вячеславовна,
канд. мед. наук, ассистент кафедры
биофизики и функциональной диа-
гностики СибГМУ, г. Томск.

E-mail: lud.smagly@yandex.ru

Область научных интересов:
регуляция электрической и со-
кратительной активности глад-
ких мышц, внутриклеточная
сигнализация, трансмембранный
ионный транспорт.

Бирулина Юлия Георгиевна,
ассистент кафедры биофизики и
функциональной диагностики
СибГМУ, г. Томск.

E-mail: birulina20@yandex.ru

Область научных интересов: регу-
ляция электрической и сократительной
активности гладких мышц, внут-
риклеточная сигнализация, транс-
мембранный ионный транспорт.

Гусакова Светлана Валерьевна,
д-р мед. наук, заведующая кафе-
дрой биофизики и функциональной
диагностики СибГМУ, г. Томск.

E-mail: gusacova@yandex.ru

Область научных интересов:
регуляция электрической и со-
кратительной активности глад-
ких мышц, внутриклеточная
сигнализация, трансмембранный
ионный транспорт.

Ковалев Игорь Викторович,
д-р мед. наук, профессор, профес-
сор кафедры биофизики и функ-
циональной диагностики СибГМУ,
г. Томск.

E-mail: kovalew@mail.ru

Область научных интересов:
регуляция электрической и со-
кратительной активности глад-
ких мышц, внутриклеточная
сигнализация, трансмембранный
ионный транспорт.

Орлов Сергей Николаевич,
д-р мед. наук, профессор лабора-
тории физико-химии биологиче-
ских мембран Московского госу-
дарственного университета.

E-mail: kovalew@mail.ru

Область научных интересов:
транспорт ионов через биологи-
ческие мембраны и внутрикле-
точная сигнализация, молекуляр-
ные основы патогенеза сердечно-
сосудистых и легочных болезней.

УДК 591.413:591.861].044: 546.221.1:599.323.4

РОЛЬ КАЛИЕВОЙ ПРОВОДИМОСТИ МЕМБРАНЫ В МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ СЕРОВОДОРОДА НА СОСУДИСТЫЕ ГЛАДКИЕ МЫШЦЫ, ПРЕДСОКРАЩЕННЫЕ АКТИВАЦИЕЙ $\alpha 1$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ

Л.В. Смаглий, Ю.Г. Бирулина, С.В. Гусакова, И.В. Ковалев,
¹С.Н. Орлов

Сибирский государственный медицинский университет,
г. Томск

¹Московский государственный университет

E-mail: birulina20@yandex.ru

Сероводород является важной сигнальной молекулой, участ-
вующей в регуляции сосудистого тонуса. Методом механогра-
фии исследовали роль АТФ-чувствительных, кальций-
активируемых и потенциал-зависимых калиевых каналов в меха-
низмах релаксирующего действия сероводорода на сосудистые
гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином – активатором
 $\alpha 1$ -адренорецепторов. Исследование проводили на деэндотели-
зированных кольцевых сегментах аорты крыс-самцов линии
Wistar. В качестве донора сероводорода использовали NaHS.
NaHS оказывал расслабляющее действие, близкое к EC₅₀, при
концентрации 100 мкМ. Блокатор кальций-активируемых и по-
тенциал-зависимых калиевых каналов тетраэтиламмоний (10
мМ) и избирательный блокатор потенциал-зависимых калиевых
каналов 4-аминопиридин (1 мМ) снижали величину расслабления
на действие 100 мкМ NaHS, тогда как блокатор АТФ-
чувствительных глибенкламид (10 мкМ) калиевых каналов пол-
ностью устранял расслабляющее действие 100 мкМ NaHS. Бло-
катор кальций-активируемых калиевых каналов большой про-
водимости харибдотоксин (0.1 мкМ) не влиял на величину расслаб-
ляющего действия 100 мкМ NaHS. Таким образом, действие се-
роводорода на гладкие мышцы аорты крысы, предсокращенные
фенилэфрином, обусловлено преимущественной активацией
АТФ-чувствительных, а также потенциал-зависимых калиевых
каналов.

Ключевые слова:

Гладкомышечные клетки, сероводород, АТФ-
чувствительные калиевые каналы, кальций-активируемые
калиевые каналы, потенциал-зависимые калиевые каналы.

Введение

Сероводород (H₂S) наряду с оксидом азота (NO) и
монооксидом углерода (CO) относят к группе газотранс-
миттеров. Как и NO, сероводород хорошо растворим в воде
и липидах и обладает высокой способностью проникать
через клеточные мембраны. В клетках и в плазме крови
млекопитающих при физиологических условиях концен-
трация H₂S варьируется в пределах 1–160 мкМ [1]. Эндо-

генный синтез H_2S осуществляется преимущественно двумя пиридоксаль-5'-фосфат-зависимыми ферментами, такими как цистотионин- β -синтаза (CBS) и цистотионин- γ -лиаза (CSE), из серосодержащей аминокислоты L-цистеина. CBS и CSE широко представлены в различных тканях, однако синтез H_2S с участием CBS происходит преимущественно в центральной нервной системе, тогда как с CSE – в сердечно-сосудистой системе (аорта, брыжеечная, легочная и хвостовая артерия, воротная вена). В некоторых других тканях, например печени и почек, синтез H_2S осуществляют оба эти фермента [2].

H_2S вовлечен в процессы как внутриклеточной, так и межклеточной коммуникации и участвует в регуляции большого числа клеточных функций, включая сосудистый тонус [3], работу центральной нервной системы [4], воспаление [2], пролиферацию, дифференцировку, гибель клеток [5] и др. В то же время механизмы оперирования H_2S как сигнальной молекулы остаются недостаточно изученными. H_2S играет существенную роль в модулировании сосудистого тонуса. Ранее было обнаружено, что H_2S в концентрациях свыше 60 мкМ расширяет кровеносные сосуды и снижает показатели артериального давления через активацию АТФ-чувствительных калиевых каналов и последующую гиперполяризацию мембран гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов [6]. По некоторым данным, H_2S активирует калиевые каналы, чувствительные к 4-аминопиридину [7], Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы малой и промежуточной проводимости [8], потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы L-типа [9], Cl^-/HCO_3^- -обменник [10]. Однако вопросы о мембранных и молекулярных мишенях, через которые реализуются такие эффекты, остаются нерешенными.

Материал и методы

Исследование сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты крысы проводили методом механографии с использованием сертифицированной четырехканальной механографической установки Myobath II и аппаратно-программного комплекса LAB-TRAX-4/16 (Германия). Объектом исследования служили деэндотелизированные сегменты грудного отдела аорты 11–13-недельных крыс – самцов линии Wistar, которых умерщвляли декапитацией под глубоким наркозом (внутрибрюшинное введение пентобарбитала натрия (Nembutal, 70 мг/кг)) в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Эндотелий удаляли вращением деревянного манипулятора в просвете сосуда. Сосудистые сегменты предварительно растягивали нагрузкой 500 мг и фиксировали с помощью стальных крючков в термостатируемых камерах объемом 10 мл, заполненных стандартным физиологическим раствором Кребса. Механическое напряжение (МН) гладкомышечных препаратов измеряли в изометрическом режиме. Амплитуду контрольных сократительных ответов сегментов на действие гиперкалиевого раствора Кребса (эквиволярное замещение 30 мМ NaCl на KCl) регистрировали после 40–50 минут выдерживания в нормальном растворе Кребса. В качестве предсокращающего фактора использовали $\alpha 1$ -адреномиметик фенилэфрин (ФЭ). Амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от амплитуды контрольного ФЭ-индуцированного сокращения (10 мкМ).

В качестве донора сероводорода использовали гидросульфид натрия (NaHS), раствор которого готовили непосредственно перед использованием. pH раствора поддерживали на уровне 7,35–7,40.

Для исследования роли калиевой проводимости мембраны в механизмах сосудорасслабляющего действия сероводорода использовали неселективный блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний (ТЭА), а также селективные блокаторы потенциал-зависимых, АТФ-чувствительных и кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости 4-аминопиридин (4-АП), глибенкламид (ГБ) и хариботоксин (ХТ) соответственно.

Результаты

Исследование влияния сероводорода на сократительную активность гладких мышц аорты крысы, предсокращенных активацией $\alpha 1$ -адренорецепторов. NaHS в концентрациях 5–1000 мкМ не влиял на исходное МН гладких мышц аорты. Активатор $\alpha 1$ -

адренорецепторов фенилэфрин (ФЭ) в концентрации 10 мкМ вызывал увеличение МН, сравнимое по амплитуде с сокращением СГМ при действии гиперкалиевого раствора Кребса. Добавление в перфузионный раствор 5, 10, 50, 100, 500, 1000 мкМ NaHS вызывало дозозависимое расслабление сосудистых сегментов, предсокращенных ФЭ, на $10,2 \pm 4,1$ %, $17,0 \pm 6,2$ %, $37,9 \pm 7,3$ %, $55,8 \pm 7,2$ %, $66,2 \pm 7,5$ % и $82,2 \pm 8,1$ % ($n = 6$, $p < 0,05$) соответственно, от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения (рис. 1).

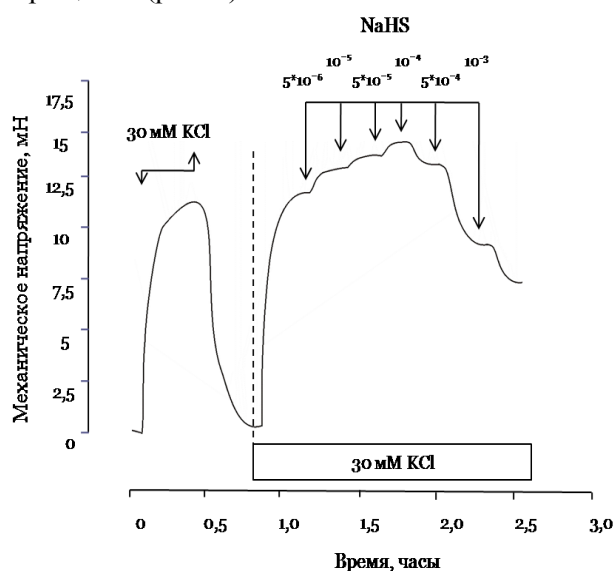


Рис. 1. Влияние гидросульфида натрия на механическое напряжение гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором Кребса. По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН). Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

Исследование роли калиевой проводимости мембраны в механизмах действия сероводорода на сократительную активность гладких мышц аорты крысы. Для исследования роли калиевой проводимости мембраны ГМК в релаксирующем действии сероводорода на сосудистые сегменты, предсокращенные фенилэфрином, использовали NaHS в концентрации 100 мкМ, при которой он оказывал расслабляющее действие, близкое к EC_{50} . Величина расслабления при этом составила $55,8 \pm 7,2$ % ($n = 6$, $p < 0,05$).

Блокатор кальций-активируемых ($K^{+}_{Ca^{2+}}$ -каналов) и потенциал-зависимых (K^{+}_V -каналов) калиевых каналов тетраэтиламмоний (10 мМ) увеличивал МН гладкомышечных сегментов, предсокращенных 10 мМ ФЭ, на $30,1 \pm 12,6$ % ($n = 6$, $p < 0,05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. На фоне действия ТЭА (10 мМ) величина расслабления гладкомышечных сегментов аорты крысы в ответ на действие 100 мкМ NaHS достоверно снижалась и составила $13,8 \pm 5,2$ % ($n = 6$, $p < 0,05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения (рис. 2А). Полученные данные указывают на возможную роль $K^{+}_{Ca^{2+}}$ -каналов и K^{+}_V -каналов в механизмах релаксирующего действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы.

Роль потенциал-зависимых калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином. Для выявления роли потенциал-зависимого компонента калиевой проводимости мембраны в механизмах релаксации сосудистых ГМК при действии сероводорода использовали селективный блокатор потенциал-зависимых калиевых каналов 4-АП. 4-АП в концентрации 1 мМ увеличивал МН сосудистых гладких мышц, предсокращенных фенилэфрином, на $27,9 \pm 5,5$ % ($n = 7$, $p < 0,05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. В присутствии 4-АП релаксирующее действие 100 мкМ NaHS достоверно снижалось: его величина составила $16,2 \pm 2,7$ % ($n = 7$, $p < 0,05$) от контрольного фенилэфрин-индуцированного сокращения (рис. 2Б). Таким образом, релаксирующее действие сероводорода на сосудистые гладкие мышцы (СГМ) аорты крысы зависит от работы K_V -каналов мембраны ГМК.

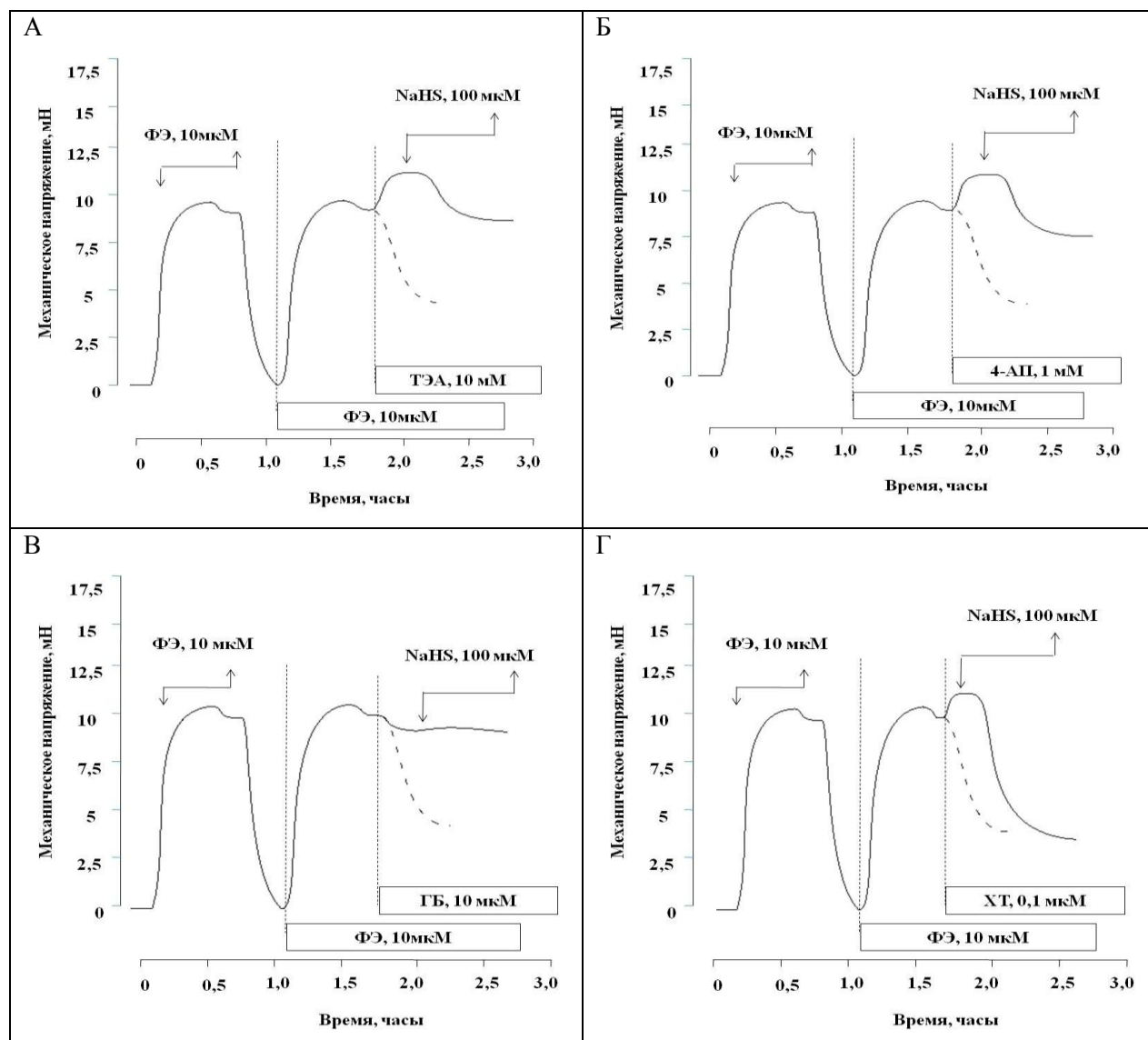


Рис. 2. Влияние тетраэтиламмония (А), 4-аминопиридина (Б), глибенкламида (В) и харибдотоксина (Г) на эффекты гидросульфида натрия (100 мкМ) в гладкомышечных сегментах аорты крысы, предсокращенных фенилэфрином. По оси ординат – механическое напряжение (мН). По оси абсцисс – время (часы). Пунктирная линия – расслабление сегмента при действии NaHS (500 мкМ) в отсутствии блокатора калиевых каналов

Роль кальций-активируемых калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином. Блокатор кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости харибдотоксин (0,1 мкМ) вызывал дополнительное увеличение величины механического напряжения гладкомышечных сегментов аорты крысы, предсокращенных ФЭ, на $13,3 \pm 1,9\%$ ($n = 4$, $p < 0,05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. Однако величина расслабления сосудистых гладких мышц при действии 100 мкМ NaHS статистически значимо не изменялась (рис. 2Д). Полученные данные исключают участие кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости в механизмах релаксирующего действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные активацией $\alpha 1$ -адренорецепторов фенилэфрином.

Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов мембраны в релаксирующем действии сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином. Для выявления вклада АТФ-чувствительных калиевых каналов ($K^+_{\text{АТФ}}$ -каналов) в индуцированном H_2S расслаблении СГМ использовали селективный блокатор $K^+_{\text{АТФ}}$ -каналов глибенкламид (10 мкМ).

ГБ (10 мкМ) снижал величину МН гладкомышечных сегментов аорты крысы, предсокращенных фенилэфрином (10 мкМ), на $12,4 \pm 4,0 \%$ ($n = 8$, $p < 0,05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. Релаксирующее действие 100 мкМ NaHS на гладкие мышцы аорты крысы отсутствовало (рис. 2Г).

Заключение

Одним из основных физиологических эффектов сероводорода является вазорелаксация. В наших исследованиях было установлено что при сокращении, вызванном активацией $\alpha 1$ -адренорецепторов, H_2S оказывал только дозозависимое релаксирующее действие на СГМ. При исследовании роли калиевых каналов в механизмах сосудорасслабляющего действия было установлено, что блокатор Ca^{2+} -активируемых и потенциал-зависимых K^+ -каналов ТЭА снижал величину расслабления СГМ при действии 100 мкМ донора сероводорода гидросульфида натрия. В то же время селективное блокирование потенциал-зависимых K^+ -каналов 4-аминопиридином ослабляло индуцированную H_2S релаксацию ГМК аорты практически в такой же степени, что и совместное выключение Ca^{2+} -активируемых и потенциал-зависимых K^+ -каналов тетраэтиламмонием. Блокирование кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости харибдотоксином не оказывало статистически значимого влияния на величину H_2S -индуцированной релаксации. Это свидетельствует о вкладе K_v -каналов в механизмы релаксирующего действия сероводорода на СГМ, предсокращенные ФЭ. Однако, учитывая практически полное отсутствие релаксирующего действия сероводорода при блокировании АТФ-чувствительных калиевых каналов глибенкламидом можно заключить, что главенствующую роль в механизмах расслабления сероводородом СГМК аорты крысы играет открывание АТФ-чувствительных калиевых каналов. Полученные данные согласуются с данными Rui Wang [8], который назвал АТФ-чувствительные калиевые каналы мембраны сосудистых ГМК главной мишенью для сероводорода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhatia M. Hydrogen sulfide as a vasodilator // IUBMB Life. – 2005. – 57. – P. 603–606.
2. Zhao W., Wang R. H_2S -induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms // Am. J. Physiol. Heart. Circ Physiol. – 2002. – 283. – P. 474–480.
3. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H_2S)-the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacol Rep. – 2007. – 59. – P. 4–24.
4. Abe K. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator / K. Abe, H. Kimura // J. Neurosci. – 1996. – 16. – P. 1066–1071.
5. Yang G. H_2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase / G. Yang, L. Wu, B. Jiang et al. // Science. – 2008. – V. 322. – P. 587–590.
6. Cheng Y. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats / Y. Cheng, J.F. Ndisang, G. Tang // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004. – 287. – P. H2316–H2323.
7. Cheang W.S. 4-Aminopyridine-sensitive K^+ channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery / W.S. Cheang, W.T. Wong, B. Shen et al // Vascular Pharmacology. – 2010. – V. 53. – P. 94–98.
8. Wang R. Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulfide // Curr Opin Nephrol Hypertens. – 2011. – V. 20(2). – P. 107–112.
9. Tian X.Y. NaHS relaxes rat cerebral artery in vitro via inhibition of l-type voltage-sensitive Ca^{2+} channel / X.Y. Tian, W.T. Wong, N. Sayed et al. // Pharmacol Res. – 2012. – V. 65(2). – P. 239–246.
10. Liu Y.H. Hydrogen sulfide and renal ischemia / Y.H. Liu, M. Lu, J.S. Bian // Expert Rev Clin Pharmacol. – 2011. – V. 4(1). – P. 49–61.

Поступила 22.01.2015 г.