

УДК 612.171;57.085.22

**ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА
НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
ПРЕДСЕРДИЯ МЫШИ В КОНТРОЛЕ И В УСЛОВИЯХ
МОДЕЛИРОВАНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА**А.С. Лифанова¹, О.В. Яковлева¹, А.Л. Зефирова²,
Г.Ф. Ситдикова¹¹Казанский (Приволжский) федеральный университет²Казанский медицинский университетE-mail: las911@rambler.ru, a-olay@yandex.ru,
Guzel.Sitdikova@kpfu.ru, zefiroval@rambler.ru**Лифанова Анастасия Сергеевна**, аспирант Казанского федерального университета.
E-mail: las911@rambler.ru

Область научных интересов: физиология, синаптический аппарат, нейромедиаторы, регуляция сердечной деятельности.

Яковлева Ольга Владиславовна, канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета.

E-mail: a-olay@yandex.ru

Область научных интересов: физиология, синаптический аппарат, нейромедиаторы, регуляция сердечной деятельности.

Ситдикова Гузель Фаритовна, д-р биол. наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета.

E-mail: Guzel.Sitdikova@kpfu.ru

Область научных интересов: физиология, синаптический аппарат, нейромедиаторы, регуляция сердечной деятельности

Зефирова Андрей Львович, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАМН, заведующий кафедрой нормальной физиологии, декан лечебного факультета Казанского медицинского университета.

E-mail: zefiroval@rambler.ru

Область научных интересов: физиология, синаптический аппарат, нейромедиаторы, регуляция сердечной деятельности.

Сероводород (H_2S) является эндогенно синтезируемым газообразным посредником, который был обнаружен в качестве регулятора сердечно-сосудистой системы. Сахарный диабет ведет к увеличению риска развития гипертензии и сердечно-сосудистых заболеваний, поэтому целью исследования был анализ сократительной функции предсердий мыши в ответ на аппликацию L-цистеина и H_2S . Сократительную активность миокарда в эксперименте *in vitro* исследовали на изолированных предсердиях мыши. Для моделирования сахарного диабета использовали аллоксан. Внутривенная инъекция аллоксана приводила к достоверному повышению концентрации глюкозы в крови, тогда как концентрация глюкозы при инъекции физиологического раствора достоверно не увеличивалась. В контроле добавление NaHS приводило к достоверному дозозависимому снижению амплитуды сокращения миокарда, тогда как в условиях моделирования сахарного диабета отрицательный инотропный эффект NaHS был достоверно ниже, чем в контрольных условиях. В контроле L-цистеин достоверно уменьшал амплитуду сокращения, в условиях моделирования сахарного диабета L-цистеин в тех же концентрациях не приводил к достоверным изменениям амплитуды сокращения. Полученные данные свидетельствуют, что чувствительность предсердия мыши к H_2S и субстрату его синтеза L-цистеину заметно снижается в условиях моделирования сахарного диабета.

Ключевые слова:

Сероводород, предсердия мыши, L-цистеин, сахарный диабет, аллоксан.

Введение

Сероводород (H_2S) является эндогенно синтезируемым газообразным посредником, который был обнаружен в качестве регулятора сердечно-сосудистой системы наряду с оксидом азота и монооксидом углерода [1]. В различных тканях H_2S синтезируется из L-цистеина ферментами цистатионин γ -лиаза (ЦГЛ), цистатионин- β синтаза (ЦБС) и 3-меркаптосульфотрансфераза (3-МКТ) [1]. В сердечно-сосудистой системе за синтез H_2S главным образом отве-

чает фермент ЦГЛ, который обеспечивает эндогенную продукцию H_2S [4]. ЦБС и ЦГЛ экс-

прессируются в островковых клетках поджелудочной железы мыши [5] H_2S оказывает расслабляющее влияние на гладкую мускулатуру, в частности на сосудистую, что имеет огромное значение для поддержания артериального давления [6, 7]. Имеются данные о кардиопротекторной роли H_2S , выражающейся в уменьшении повреждений миокарда в условиях ишемии/реперфузии в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [3, 8]. Диабет является хроническим нарушением обмена веществ, что влияет на метаболизм углеводов и других веществ в результате нарушения секреции инсулина и/или из-за резистентностью к инсулину. Существует ряд доказательств, что при развитии диабета происходит нарушение метаболизма серосодержащих аминокислот, таких как метионин, гомоцистеин, L-цистеин, а также продукции H_2S [9–11]. В связи с тем, что сахарный диабет ведет к увеличению риска развития гипертензии и сердечно-сосудистых заболеваний, целью исследования был анализ сократительной функции предсердий мыши в ответ на аппликацию цистеина и сероводорода.

Материалы и методы

Эксперименты по регистрации сократимости проводились на предсердиях мыши на установке Biopac Systems, Inc. (США). Мышей декапитировали под эфирным наркозом и производили препаровку – быстро вскрывали грудную клетку и выделяли предсердия, который подвешивали вертикально в ванночке объемом 20 мл. Снизу предсердие жестко фиксировали к блоку, верхний конец соединяли с тензометрическим датчиком (TSD125C, Biopac Systems, Inc., США) с диапазоном чувствительности 0–50 г.

В течение эксперимента препарат омывался раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 154; KCl – 5; CaCl₂ – 2; MgSO₄ – 1, глюкоза – 11 ($t = 20$ °C, pH 7,2–7,4). Раствор Кребса перфузировали карбогеном в течение всего эксперимента. Препарат стимулировали электрическими импульсами через два платиновых электрода (с помощью стимулятора ЭСЛ-2 (Россия)) с частотой стимулов 0,1 Гц амплитудой сигнала 40 мВ, продолжительность стимула 5 мс. После погружения препарата в резервуар следовал период приработки в течение 40–60 мин, в ходе которого мышечным волокнам постепенно придавалось оптимальное напряжение.

Запись кривой сокращения регистрировали на персональном компьютере при помощи программного обеспечения Elf (автор А.В. Захаров). Достоверность различий определяли с помощью параметрического t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

В качестве донора H_2S использовали гидросульфид натрия (NaHS), так как в водном растворе он диссоциирует до Na^{2+} и HS^- , затем HS^- связывается с H^+ с образованием H_2S . В нейтральном растворе одна треть NaHS находится в виде газа H_2S , и оставшиеся две трети в виде HS^- [12]. В экспериментах также использовали L-цистеин в качестве субстрата синтеза H_2S .

Для создания модели сахарного диабета, использовали аллоксан (Sigma) в концентрации 200–250 мг/кг веса. Уровень сахара крови определялся перед введением аллоксана и каждые 10 суток глюкометром Accu-Chek Active. Для развития диабета животных содержали на протяжении 45 суток. Кровь для анализа уровня глюкозы брали из хвостовой вены. Все используемые реактивы фирмы Sigma (США).

Результаты исследования

Влияние аллоксана на концентрацию глюкозы в крови экспериментальных мышей. Для моделирования сахарного диабета мышам после суточного голодания внутрибрюшинно инъецировали аллоксан (200–250 мг/кг). Аллоксан обладает избирательной токсичностью к β -клеткам островков Лангерганса поджелудочной железы. Известно, что аллоксан имеет два механизма действия на ткань поджелудочной железы: селективно ингибирует глюкозозависимую секрецию инсулина через ингибирование глюкокиназы, сенсора глюкозы в β -клетках и вызывает образование свободных радикалов, в результате чего наблюдается некроз этих клеток [13]. В контроле концентрация глюкозы составляла $3,5 \pm 1$ мМ/л ($n = 55$), после инъекции препарата на 10-й и 20-й день у мышей опытной группы наблюдалось

недостойное повышение концентрации глюкозы ($p > 0,05$), а начиная с 30 суток концентрация глюкозы достоверно отличалась от контрольных значений, полученных у мышей с инъекцией физиологического раствора. На 45 сутки животных из опыта брали для исследований.

Влияние донора H_2S на амплитуду сокращения миокарда. Для исследования эффектов экзогенного H_2S использовали донор NaHS, который кумулятивно апплицировали на препарат предсердия мыши в концентрациях 100, 200 и 300 мкМ. В контроле добавление NaHS приводило к дозозависимому снижению амплитуды сокращения миокарда на $15 \pm 3\%$ ($n = 14$, $p < 0,05$), $41 \pm 6\%$ ($n = 14$, $p < 0,05$) и $61 \pm 4\%$ ($n = 15$, $p < 0,05$) соответственно (рис. 1). В условиях моделирования сахарного диабета первого типа после аппликации NaHS амплитуда сокращения изменялась на $2 \pm 2\%$ ($n = 6$, $p > 0,05$), $6 \pm 4\%$ ($n = 5$, $p > 0,05$), $46 \pm 12\%$ ($n = 5$, $p < 0,05$), что достоверно отличается от контрольных значений для концентраций 100 и 200 мкМ (рис. 1). Таким образом, в условиях моделирования сахарного диабета отрицательный инотропный эффект NaHS был достоверно ниже, чем в контрольных условиях.

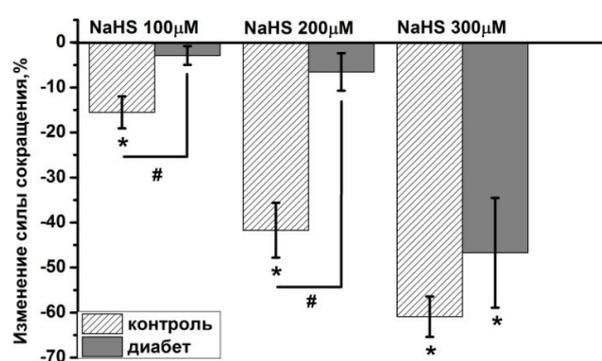


Рис. 1. Влияние NaHS на сократимость предсердий мыши в контроле и условиях моделирования сахарного диабета: * – $p < 0,05$ по отношению к исходным значениям; # – $p < 0,05$ между эффектами NaHS в контроле и в условиях моделирования сахарного диабета

Влияние субстрата синтеза H_2S на амплитуду сокращения миокарда. L-цистеин является основным субстратом синтеза H_2S в тканях. В контроле добавление L-цистеина в концентрациях 1, 10, 50 мкМ приводило к достоверному уменьшению амплитуды сокращения до $95 \pm 1\%$ ($n = 7$, $p < 0,05$), $94 \pm 1\%$ ($n = 6$, $p < 0,05$), $88 \pm 3\%$ ($n = 6$, $p < 0,05$) соответственно (рис. 2). В условиях моделирования сахарного диабета аппликация L-цистеина в тех же концентрациях не приводила к достоверным изменениям амплитуды сокращения, которая составила $99 \pm 1\%$ ($n = 6$, $p > 0,05$), $98 \pm 2\%$ ($n = 6$, $p > 0,05$), $98 \pm 2\%$ ($n = 6$, $p > 0,05$) (рис. 2).

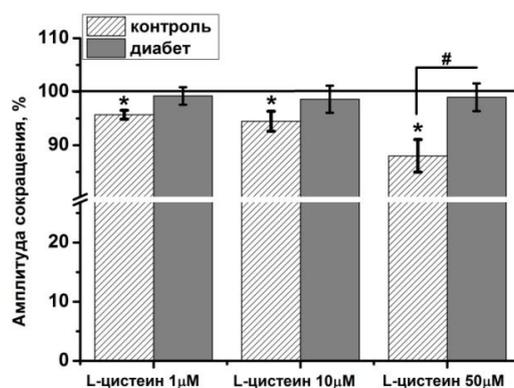


Рис. 2. Влияние L-цистеина на сократимость предсердий мыши в контроле и условиях моделирования сахарного диабета: * – $p < 0,05$ по отношению к исходным значениям; # – $p < 0,05$ между эффектами цистеина в контроле и в условиях моделирования сахарного диабета

Таким образом, нами было показано, что чувствительность предсердия мыши к H_2S и субстрату его синтеза L-цистеину заметно снижается в условиях моделирования сахарного диабета. Из литературных источников известно, что синтез H_2S значительно повышается у крыс при моделировании сахарного диабета стрептозотоцином [11], при этом показано двухфазное влияние H_2S на клетки поджелудочной железы, в низких концентрациях H_2S ингибировал высвобождение инсулина [14]. Однако также было показано, что реактивность сосудов, уровень H_2S в плазме, сосудистый синтез H_2S при моделировании сахарного диабета у мышей снижаются [10]. Эти данные подтверждаются и наблюдениями об уровне сульфидов в плазме у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и у гипертензивных крыс. В наших экспериментах было показано, что в условиях развития сахарного диабета не проявляется эффект L-цистеина – субстрата синтеза H_2S – на сократительную функцию предсердия мыши, что, по-видимому, может быть связано с нарушением работы фермента CSE. При этом мы также наблюдали меньшую реакцию предсердия на экзогенную аппликацию донора H_2S , что указывает на изменение чувствительности мишеней действия газа в условиях моделирования сахарного диабета. Дальнейшие исследования позволят выявить механизмы нарушения регуляции сократительной функции предсердий H_2S и другими газомедиаторами.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-97081/12

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sitdikova G.F., Zefirov A.L. Serovodород: ot kanalizacij Parizha k signal'noj molekule // Priroda. – 2010. – № 9. – С. 29–37.
2. Hermann A., Sitdikova G.F., Weiger T. Gasotransmitter fluchtige Ubertragerstoffe // Arzte Woche, SpringerMedizine. – 2010. – № 42. – P. 10.
3. Gadalla M.M., Snyder S.H. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter // J Neurochem. – 2010. – V. 113(1). – P. 14–26.
4. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K(ATP)-channel opener / Zhao W, Zhang J, Lu Y et al. // EMBO J. – 2001. – V. 20. – P. 6008–6016.
5. L-Cysteine Inhibits Insulin Release From the Pancreatic β -Cell. Possible Involvement of Metabolic Production of Hydrogen Sulfide, a Novel Gasotransmitter / Yukiko Kaneko, Yuka Kimura, Hideo Kimura, Ichiro Niki // Diabetes. – 2006. – V. 55. – P. 1391–1397.
6. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? // FASEB J. – 2002. – V. 16. – P. 1792–1798.
7. H_2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase / Yang G., Wu L., Jiang B. et al. // Science. – 2008. – V. 322. – P. 587–590.
8. H_2S generated by heart in rat and its effects on cardiac function / Geng B., Yang J., Qi Y. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – V. 313. – P. 362–368.
9. Disturbed homocysteine and methionine cycle intermediates S-adenosyl-homocysteine and S-adenosylmethionine are related to degree of renal insufficiency in type 2 diabetes / Herrmann W., Schorr H., Obeid R. et al. // Clin Chem. – 2005. – V. 51. – P. 891–897.
10. Biosynthesis of H_2S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice / Brancaleone V., Roviezzo F., Vellecco V. et al. // British Journal of Pharmacology, 2008. – V. 155. – P. 673–680.
11. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis / Yusuf M., Huat B.T.K., Hsu A. et al. // Biochem Biophys Res Commun. – 2005. – V. 333. – P. 1146–1152.
12. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity / Beauchamp R.O. Jr, Bus J.S., Popp J.A. et al. // Crit Rev Toxicol. – 1984. – V. 13(1). – P. 25–97.
13. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes // Diabetologia. – 2008. – V. 51(2). – P. 216–226.
14. Hydrogen sulphide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a KATPchannel-dependent pathway / Ali M.Y., Whiteman M., Low C.M., Moore P.K. // J Endocrinol. – 2007. – V. 195. – P. 105–112.

15. H₂S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells / Yang G., Yang W., Wu L., Wang R. // J Biol Chem. – 2007. – V. 292. – P. 16567–16576.

Поступила 22.01.2015 г.