

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,  
<sup>1</sup>С.Н. ОрловСибирский государственный медицинский университет,  
г. Томск<sup>1</sup>Московский государственный университет  
E-mail: birulina20@yandex.ru**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: регуля-  
ция электрической и сократительной  
активности гладких мышц, внут-  
риклеточная сигнализация, транс-  
мембранный ионный транспорт.**Гусакова Светлана Валерьевна**,  
д-р мед. наук, заведующая кафед-  
рой 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.

Сероводород является важной сигнальной молекулой, участвующей в регуляции сосудистого тонуса. Методом механографии исследовали роль АТФ-чувствительных, кальций-активируемых и потенциал-зависимых калиевых каналов в механизмах релаксирующего действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные фенилэфрином – активатором  $\alpha$ 1-адренорецепторов. Исследование проводили на деэндотелизированных 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 потенциал-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 полностью устранял расслабляющее действие 100 мкМ NaHS. Блокатор кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости харибдотоксин (0.1 мкМ) не влиял на величину расслабляющего действия 100 мкМ NaHS. Таким образом, действие сероводорода 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 ( $H_2S$ ) наряду с оксидом азота (NO) и монооксидом углерода (CO) относят к группе газотрансмиттеров. 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 концентрация  $H_2S$  варьируется в пределах 1–160 мкМ [1]. Эндо-

генный синтез  $H_2S$  осуществляется преимущественно двумя пиридоксаль-5'-фосфат-зависимыми ферментами, такими как цистотионин- $\beta$ -синтаза (CBS) и цистотионин- $\gamma$ -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 (эквимолярное 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).

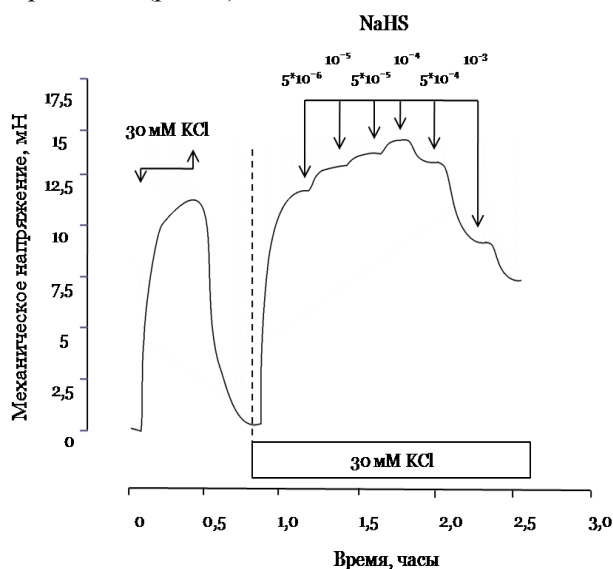
В качестве донора сероводорода использовали гидросульфид натрия (NaHS), раствор которого готовили непосредственно перед использованием. pH раствора поддерживали на уровне 7,35–7,40.

Для исследования роли калиевой проводимости мембраны в механизмах сосудораслабляющего 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 харибдотоксин (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).

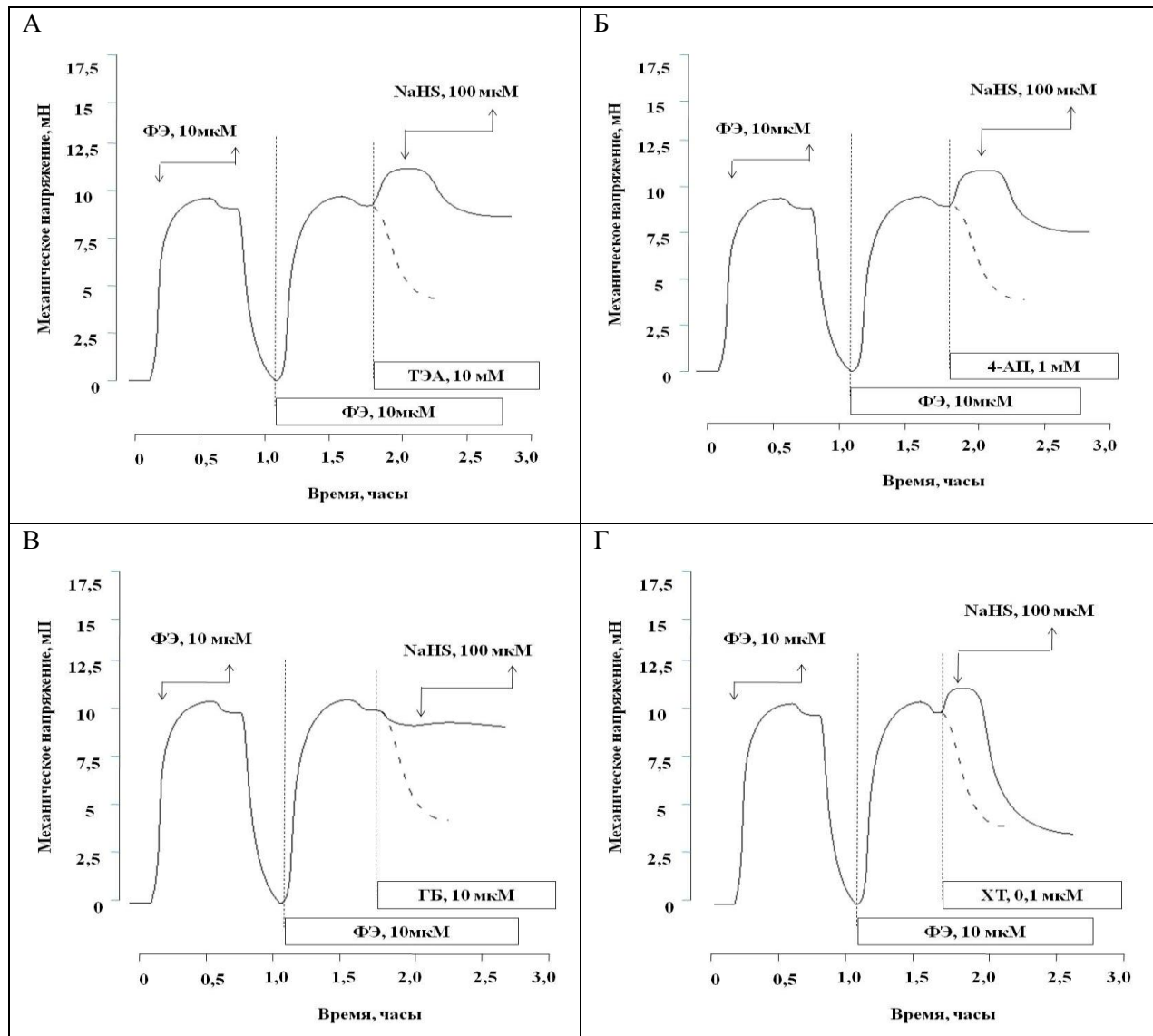


**Рис. 1.** Влияние гидросульфида натрия на механическое напряжение гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором Кребса. По оси абсцисс – время (часы). По оси ординат – механическое напряжение (мН). Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов.

**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-амилопиридина (Б), глибенкламида (В) и хариботоксина (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 хариботоксин (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  $\gamma$ -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.