

РЕЛАКСИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СЕРОВОДОРОДА НА ГЛАДКОМЫШЕЧНЫЕ КЛЕТКИ: РОЛЬ КАЛИЕВОЙ ПРОВОДИМОСТИ МЕМБРАНЫ

Смаглий Л. В.¹, Желудева А. С.¹, Гусакова С. В.¹, Баскаков М. Б.^{1,2}, Ковалев И. В.¹, Вторушина Т. А.¹, Орлов С. Н.³

¹ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России», Томск, Россия (634050, ул. Московский тракт, 2), e-mail: lud.smagly@yandex.ru

²ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, Россия (634050, пр. Ленина, 30)

³Научно-исследовательский центр Университета г. Монреаль (2901 Rachel Street East, room 313, Montreal, Quebec, H1W 4A4 Canada)

Методом механографии было изучено влияние сероводорода на сократительные реакции гладкомышечных клеток аорты крысы, индуцированные деполяризацией клеточной мембраны гиперкалиевым раствором и стимуляцией α_1 -адренорецепторов фенилэфрином. Была исследована роль калиевых каналов мембраны в опосредовании релаксирующего действия сероводорода и проанализирован вклад трех основных компонентов калиевой проводимости мембраны: потенциал-зависимого, кальций-чувствительного и АТФ-чувствительного. В результате были получены данные, согласно которым основная роль в опосредовании релаксирующего действия сероводорода на гладкомышечные клетки сосудов при деполяризации мембраны гиперкалиевым раствором принадлежит потенциал-зависимым калиевым каналам. Вазорелаксирующее действие сероводорода при действии α_1 -адреномиметика фенилэфрина обусловлено активацией как потенциал-зависимых, так и АТФ-чувствительных калиевых каналов. Значимого влияния на релаксирующее действие сероводорода кальций-чувствительных калиевых каналов выявлено не было.

Ключевые слова: гладкомышечные клетки, сероводород, калиевые каналы.

HYDROGEN SULFIDE VASORELAXING ACTION: ROLE OF POTASSIUM CONDUCTANCE OF MEMBRANE

Smaglyi L. V.¹, Zheludeva A. S.¹, Gusakova S. V.¹, Baskakov M. B.¹, Kovalev I. V.^{1,2}, Vtorushina T. A.¹, Orlov S. A.³

¹Siberian State Medical University, Tomsk, Russia (634050, street Moskovskiy trakt 2), e-mail: lud.smagly@yandex.ru

²National Research Tomsk Polytechnic University (634050, street Lenina prospect 30)

³Research Center, University of Montreal Hospital (CHUM) (2901 Rachel Street East, room 313, Montreal, Quebec, H1W 4A4 Canada)

Hydrogen sulfide influence on rat aorta smooth muscle cells contractions induced by membrane depolarization with highpotassium solution and stimulation of α_1 -adrenoreceptors with phenylefrine was investigated with method of mechanography. We investigated the role of potassium channels of the membrane in the relaxing action of hydrogen sulfide and analyzed the contribution of the three main components of the membrane potassium conductance: voltage-dependent, calcium-sensitive, and ATP-sensitive potassium conductance. Results that we obtained suggests the primary role of the voltage-dependent potassium channels in mediating hydrogen sulfide relaxing effect on vascular smooth muscle cells in membrane depolarization with highpotassium solution. Hydrogen sulfide vasorelaxing effect on smooth muscle cells precontracted with α_1 -adrenomimetic phenylephrine is mediated by a voltage-dependent and ATP-sensitive potassium channels. Significant impact of calcium-sensitive potassium channels in the relaxing effect of hydrogen sulfide haven't been revealed.

Key words: smooth muscle cells, hydrogen sulfide, potassium channels.

Введение. Сероводород (H_2S), являясь представителем так называемых газотрансмиттеров, способен оказывать модулирующее действие на функциональное состояние различных клеток организма человека и млекопитающих [1.a.i.5,1.a.i.6]. Одним из основных физиологических эффектов H_2S является его способность вызывать расслабление гладкомышечных клеток (ГМК) сосудистой стенки [1.a.i.8]. Однако, как было показано нами

ранее, действие H_2S может зависеть от механизма, лежащего в основе индукции сокращения. Если на фоне сокращения, индуцированного α_1 -адреномиметиком фенилэфрином, на всем диапазоне выбранных концентраций наблюдалось дозозависимое расслабление гладкомышечных препаратов, то на фоне сокращения, индуцированного деполяризацией мембраны гиперкалиевым раствором, сероводород оказывал двухфазное действие, увеличивая величину механического напряжения при малых концентрациях (5-100 мкМ) и снижая при больших (100-1000 мкМ) [1.a.i.1]. Тем не менее, исходя из потенциального антигипертензивного действия сероводорода, наибольший интерес вызывает его вазорелаксирующее действие.

Наиболее вероятным механизмом релаксирующего действия H_2S считают увеличение выходящего калиевого тока, в основном, за счет активации АТФ-чувствительных калиевых каналов ($\text{K}^+_{\text{АТФ}}$ -каналов) [1.a.i.4,7]. Вовлечение в данный процесс других типов калиевых каналов, таких как потенциал-зависимые (K^+_v -каналы) и кальций-чувствительные ($\text{K}^+_{\text{Ca}^{2+}}$ -каналы) калиевые каналы, долгое время отрицалось [1.a.i.9]. Несмотря на это, все чаще встречаются сообщения об активирующем влиянии сероводорода на $\text{K}^+_{\text{Ca}^{2+}}$ -каналы высокой проводимости, либо K^+_v -каналы, которые, предположительно, могут играть не менее значимую роль в реализации релаксирующего действия H_2S [1.a.i.2,1.a.i.3]. Таким образом, к настоящему времени окончательного решения по вопросу механизмов действия сероводорода не найдено.

Цель исследования. Изучить роль калиевых каналов в опосредовании релаксирующего действия сероводорода.

Материалы и методы. Объектом исследования служили дезэндотелизированные гладкомышечные сегменты грудного отдела аорты беспородных белых крыс весом 180–250 гр. После выделения аорту помещали в физиологически сбалансированный солевой раствор Кребса, отпрепаровывали жировую и соединительную ткань и выделяли сегменты шириной 2–3 мм. Эндотелий удаляли механически, вращением деревянного шпателя в просвете сегмента в течение 1 минуты непосредственно перед выполнением эксперимента.

Исследование сократительной активности гладкомышечных препаратов проводили с использованием сертифицированной четырехканальной механографической установки Myobath II и аппаратно-программного комплекса LAB-TRAX-4/16. Гладкомышечные сегменты фиксировали с помощью стальных крючков в термостатируемой камере объемом 10 мл и предварительно растягивали нагрузкой 500 мг.

Амплитуду контрольных (100 %) сократительных ответов сосудистых сегментов на действие гиперкалиевого раствора (замена 30 мМ NaCl на KCl) или фенилэфрина (10 мкМ) регистрировали после 40–50 минут выдерживания в нормальном растворе Кребса.

Физиологический раствор Кребса содержал (мМ): 120.4 NaCl, 5.9 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 5.5 глюкозы, 15 C₄H₁₁O₃N [tris(oxymethyl)-aminometan] (pH 7.4; 316.4 мОМ). В качестве донора сероводорода использовали гидросульфид натрия (NaHS).

Используемые реактивы: 4-аминопиридин (Sigma); гидросульфид натрия (Sigma); глибенкламид (Sigma); тетраэтиламмония хлорид (Serva); фенилэфрин (Sigma); харибдотоксин (Sigma).

Статистическая обработка. Анализ данных проводили при помощи программы Statistica 7.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде «среднее ± ошибка среднего» ($\bar{X} \pm m$). Сформированные выборки не подчинялись закону нормального распределения, поэтому для проверки статистических гипотез были использованы U-критерий Манна – Уитни (Mann-Whitney U test) и Т-критерий Уилкоксона (Wilcoxon matched pairs test).

Результаты и обсуждение

Исследование роли калиевой проводимости мембраны в опосредовании вазорелаксирующего действия сероводорода при гиперкалиевом сокращении

Эквимоллярное замещение в растворе Кребса 30мМ NaCl на KCl приводило к развитию поддерживаемого сократительного ответа, величина которого принималась за 100 %.

Неизбирательный блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний (ТЭА) в концентрации 10мМ увеличивал механическое напряжение (МН) гладкомышечных сегментов аорты крысы, предсокращенных гиперкалиевым раствором до 109.1±1.0% (n=4, p<0.05). В присутствии ТЭА величина констрикторного действия 5, 10, 50 и 100 мкМ NaHS снижалась, составив 103.8±0.9 %, 104.9±1.7 %, 108.5±2.5 % и 116.7±3.7 % (n=6, p<0.05) соответственно. NaHS в концентрации 500 мкМ вызывал сокращение гладкомышечного сегмента до 106.4±7.8 % (n=6, p<0.05), а релаксирующее влияние 1000 мкМ NaHS ослаблялось: МН составило только 95.4±7.1 % (n=6, p<0.05) от амплитуды гиперкалиевого предсокращения в присутствии ТЭА (рис.1А).

Блокатор K⁺_{АТФ}-каналов глибенкламид (10мкМ) снижал величину МН гладкомышечных препаратов, предсокращенных гиперкалиевым раствором до 95,5±1,6 % (n=6, p<0.05) от контрольного гиперкалиевого сокращения. На этом фоне констрикторное действие 5, 10, 50 и 100 мкМ NaHS обращалось на релаксирующее, при этом величина МН составила 95.3±2.4 %, 93.1±3.6 %, 90.1±4.4 % и 76.6±10.5 % (n=6, p<0.05) соответственно от величины гиперкалиевого сокращения в присутствии глибенкламида; величина релаксирующего эффекта 500 и 1000 мкМ NaHS достоверно не изменялась (рис.1Б).

Блокатор K_v^+ -каналов 4-аминопиридин (1мМ) увеличивал амплитуду сократительного ответа до 127.9 ± 5.5 % ($n=4$, $p<0.05$) от контрольного гиперкалиевого предсокращения. При этом наблюдалось снижение как величины констрикторного действия 10, 50 и 100 мкМ NaHS (107.7 ± 1.7 %, 107.9 ± 4.2 % и 106.8 ± 7.4 % ($n=4$, $p<0.05$) соответственно), так и величины релаксирующего действия 500 и 1000 мкМ NaHS (80.4 ± 5.3 % и 76.5 ± 1.2 % ($n=4$, $p<0.05$) соответственно, от гиперкалиевого сокращения в присутствии 4-аминопиридина) (рис.1В).

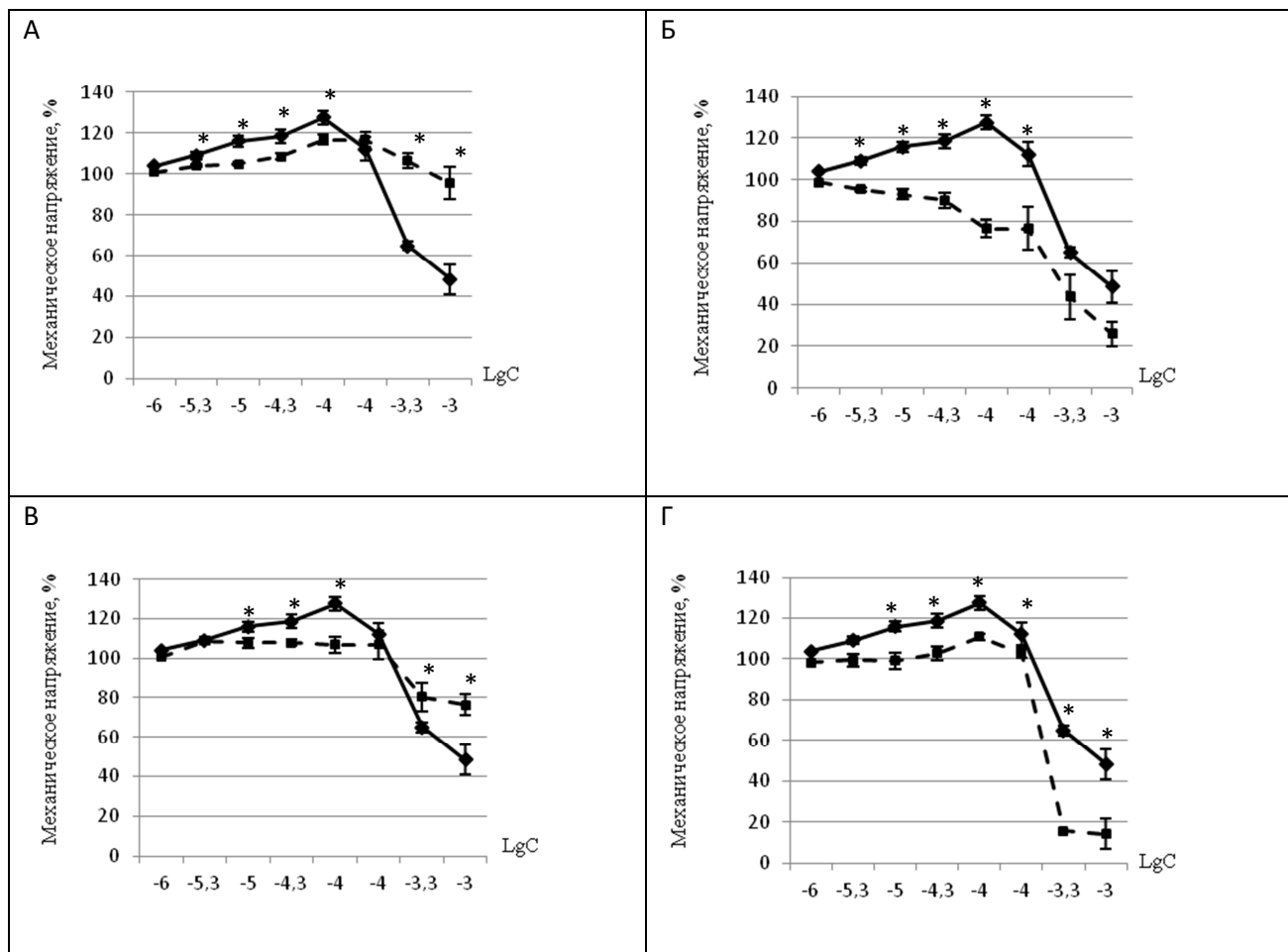


Рис. 1. Влияние тетраэтиламмония (А), глибенкламида (Б), 4-аминопиридина (В) и харибдотоксина (Г) на эффекты гидросульфида натрия в гладкомышечных клетках аорты крысы, предсокращенных гиперкалиевым (30мМ KCl) раствором

—◆— — гиперкалиевое сокращение; —■— — гиперкалиевое сокращение в присутствии блокатора калиевых каналов. По оси ординат — механическое напряжение (%). По оси абсцисс — десятичный логарифм концентрации гидросульфида натрия.

* — отмечены достоверные отличия механического напряжения после добавления гидросульфида натрия от гиперкалиевого сокращения в присутствии блокатора ($p<0.05$).

Блокатор $K_{Ca^{2+}}$ -каналов харибдотоксин (0.1 мкМ) не изменял величину гиперкалиевого предсокращения, но устранял констрикторное действие 5, 10, 50 и 100 мкМ NaHS (МН составило 99.5 ± 4.0 %, 99.3 ± 3.5 %, 102.8 ± 1.6 % и 102.9 ± 0.2 % ($n=3$, $p<0.05$) соответственно, от гиперкалиевого сокращения в присутствии харибдотоксина).

Релаксирующее действие 500 и 1000 мкМ NaHS усиливалось (МН составило 15.6 ± 7.5 % и 14.1 ± 6.3 % ($n=3$, $p<0.05$) соответственно, от гиперкалиевого сокращения в присутствии харибдотоксина) (рис.1Г).

Исследование роли калиевой проводимости мембраны в опосредовании вазорелаксирующего действия сероводорода при сокращении, индуцированном фенилэфрином

Добавление в омывающий раствор Кребса α_1 – адреномиметика фенилэфрина (ФЭ, 10мкМ) вызывало сократительный ответ по амплитуде сравнимый с гиперкалиевым.

Инкубация с ТЭА приводила к увеличению МН гладкомышечных сегментов, предсокращенных 10 мМ ФЭ, до 130.1 ± 12.6 % ($n=6$, $p<0.05$). На этом фоне NaHS (5, 10, 50 мкМ) вызывал увеличение МН гладкомышечных сегментов до 111.98 ± 5.3 %, 109.4 ± 4.7 % и 113.7 ± 9.0 % ($n=9$, $p<0.05$) соответственно, а расслабляющее действие 100, 500 и 1000 мкМ NaHS уменьшалось, величина МН составила только 77.6 ± 9.7 %, 61.6 ± 6.2 % и 54.9 ± 3.6 % ($n=9$, $p<0.05$) соответственно, от ФЭ-индуцированного предсокращения в присутствии ТЭА (рис.1А).

Блокатор K^+_{ATP} -каналов глибенкламид (10 мкМ) снижал величину предсокращения фенилэфрином до 87.6 ± 4.0 % ($n=8$, $p<0.05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. NaHS в концентрациях 10 и 100 мкМ не изменял величину сократительного ответа. При действии 50 мкМ NaHS наблюдалось увлечение МН сосудистых сегментов до 113.6 ± 10.8 % ($n=8$, $p<0.05$), а эффективность расслабляющего действия 500 и 1000 мкМ NaHS достоверно снижалась: МН составило 81.5 ± 12.2 % и 53.1 ± 12.6 % ($n=8$, $p<0.05$) соответственно, от величины ФЭ-индуцированного сокращения в присутствии глибенкламида (рис.2Б).

Блокатор K^+_{v} -каналов 4-аминопиридин (1мМ) увеличивал МН до 127.9 ± 5.5 % ($n=7$, $p<0.05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. В этих условиях расслабляющее действие 5, 10 и 50 мкМ NaHS усиливалось (МН составило 74.5 ± 3.4 %, 66.9 ± 2.8 %, 57.7 ± 2.2 %, ($n=7$, $p<0.05$) соответственно), а релаксирующий эффект 100, 500 и 1000 мкМ NaHS достоверно снижался (МН составило 66.4 ± 5.6 %, 64.1 ± 3.8 %, 51.5 ± 9.0 %, ($n=7$, $p<0.05$), соответственно от контрольного ФЭ-индуцированного предсокращения в присутствии 4-аминопиридина) (рис.2В).

Блокатор K^+_{Ca2+} -каналов харибдотоксин (0.1 мкМ) увеличивал МН до 113.3 ± 10.9 % ($n=3$). На этом фоне величина релаксирующего действия 5, 10 мкМ NaHS достоверно увеличивалась (МН составило 58.8 ± 4.0 %, 50.4 ± 7.3 % ($n=3$, $p<0.05$) соответственно, от величины ФЭ-индуцированного сокращения в присутствии харибдотоксина). Величина

релаксирующего действия 50, 100, 500, 1000 мкМ NaHS статистически значимо не изменялась (рис.2Г).

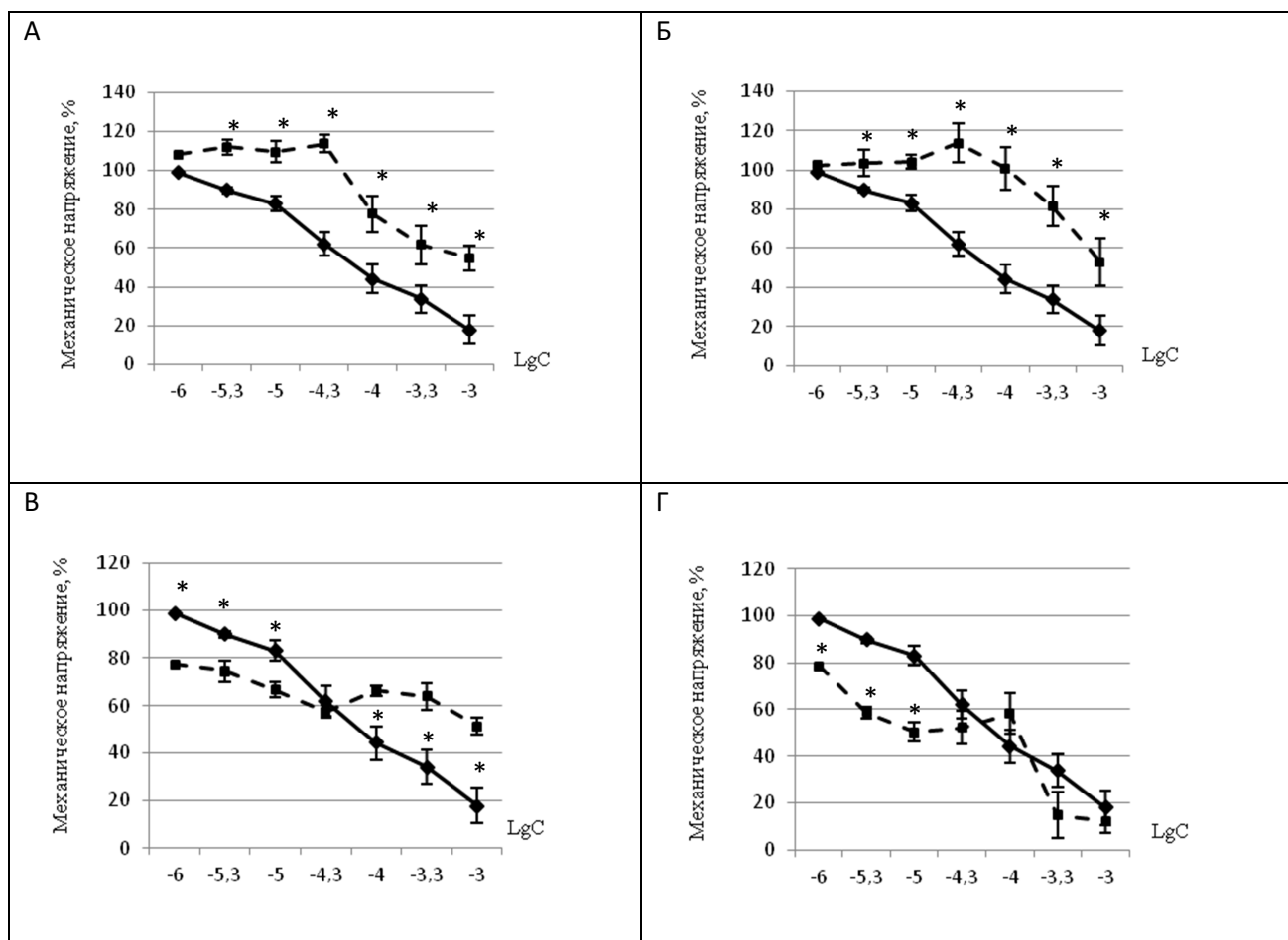


Рис. 2. Влияние тетраэтиламмония (А), глибенкламида (Б), 4-аминопиридина (В) и харибдотоксина (Г) на эффекты гидросульфида натрия в гладкомышечных клетках аорты крысы, предсокращенных раствором фенилэфрина (10мкМ)

—◆— — фенилэфрин-индуцированное сокращение; —■— — фенилэфрин-индуцированное сокращение в присутствии блокатора калиевых каналов. По оси ординат — механическое напряжение (%). По оси абсцисс — десятичный логарифм концентрации гидросульфида натрия.

* — отмечены достоверные отличия механического напряжения после добавления гидросульфида натрия от фенилэфрин-индуцированного сокращения в присутствии блокатора ($p < 0.05$).

Закключение. Модулирование сократительной функции гладкомышечных клеток, и в частности сосудистых ГМК, требует детальных знаний о механизмах регуляции развития и поддержания сокращения. Сероводород относится к классу газовых сигнальных посредников, выполняющих в клетке регуляторную функцию. Соответственно, изучение механизмов влияния H_2S на функциональную активность клеток может иметь значение не

только с позиции фундаментального знания о принципах регуляции внутриклеточных сигнальных систем, но и с точки зрения терапевтической и профилактической значимости. Вазодилатирующие свойства сероводорода позволяют рассматривать его как потенциальное антигипертензивное средство [1.a.i.5,1.a.i.6].

Основным механизмом реализации релаксирующего действия H_2S является активация калиевой проводимости мембраны. Так, неселективный блокатор калиевых каналов ТЭА ингибировал релаксирующее действие NaHS как при гиперкалиевом, так и при ФЭ-индуцированном сокращении. Традиционно главной мишенью для сероводорода считаются $\text{K}^+_{\text{АТФ}}$ -каналы [1.a.i.4]. Однако эксперименты, проведенные с селективными блокаторами основных типов калиевых каналов, таких как $\text{K}^+_{\text{Ca}^{2+}}$ -каналы, K^+_{v} -каналы и $\text{K}^+_{\text{АТФ}}$ -каналы, показали, что основную роль в данном процессе играют потенциал-зависимые калиевые каналы. Полученные результаты согласуются с данными некоторых авторов [1.a.i.2,1.a.i.3]. Значимость этих каналов для H_2S -опосредованной релаксации ГМК подтверждена для сократительных реакций, индуцированных как активацией α_1 -адренорецепторов, так и деполяризацией мембраны гиперкалиевым раствором. Вовлечение в релаксирующее действие сероводорода $\text{K}^+_{\text{АТФ}}$ -каналов выявлено только для сокращений, индуцированных ФЭ.

Блокирование $\text{K}^+_{\text{Ca}^{2+}}$ -каналов высокой проводимости харибдотоксином усиливало релаксирующее действие NaHS при деполяризации мембраны ГМК гиперкалиевым раствором, но не оказывало значимого влияния при активации α_1 -адренорецепторов. Учитывая тот факт, что активация С-киназной ветви кальциевой сигнальной системы посредством α_1 -адренорецепторов индуцирует высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, и роль этого механизма при деполяризации мембраны гиперкалиевым раствором выражена в меньшей степени, то можно предположить, что H_2S – индуктор увеличения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} за счет высвобождения его из внутриклеточного депо, может быть причиной дополнительной активации $\text{K}^+_{\text{Ca}^{2+}}$ -каналов. Это, в свою очередь, может обуславливать парадоксальную реакцию усиления релаксирующего действия H_2S при блокировании K^+ -тока.

Таким образом, релаксирующее действие сероводорода при деполяризации мембраны гиперкалиевым раствором обусловлено преимущественно потенциал-зависимыми калиевыми каналами, тогда как релаксирующее действие сероводорода при фенилэфрин-индуцированном сокращении опосредовано потенциал-зависимыми и АТФ-чувствительными калиевыми каналами.

Список литературы

1. Баскаков М. Б. Влияние сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы / М. Б. Баскаков, С. В. Гусакова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – №6. – С.12-17.
2. 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. – №53. – P.94–98.
3. Chung S. Modulation of the inactivation of voltage-dependent potassium channels by cAMP / S. Chung, L. K. Kaczmarek // The journal of neuroscience. – 1995. – Vol.15 (5). – P.3927-3935.
4. Jang G. Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells / G. Jang, L. Wu, W. Liang, R. Wang // Mol. Pharmacol. – 2005. – № 68. – P. 1757-1764.
5. Lowicka E. Hydrogen sulfide – the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacol. Reports. – 2007. – №59. – P.4-24.
6. Skovgaard N. The Role of Endogenous H₂S in Cardiovascular Physiology / N. Skovgaard, A. Gouliaev, M. Aalling, U. Simonsen // Curr Pharm Biotechnol. – 2011. – Vol.12. – P.1385-1393.
7. Wagner C. A. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator / C. A. Wagner // Journal of Nephrology. – 2009. – Vol.22(2). – P.173-176.
8. Zhao W. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms / W. Zhao, R. Wang // Am. J. Physiol. Heart. Circ Physiol. – 2002. – №283. – P.474–480.
9. Zhao W. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang // The EMBO Journal. – 2001. – Vol.20 (21). – P. 6008-6016.

Исследование выполнено в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (ГК№14.740.11.0932) и регионального конкурса РФФИ р_сибирь_a (ГК№11-04-98073).

Рецензенты:

Ласукова Татьяна Викторовна, доктор биологических наук, профессор кафедры медико-биологических дисциплин ГБОУ ВПО Томский государственный педагогический университет Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Томск.

Капилевич Леонид Владимирович, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины, ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск.