

УДК 591.413:591.861:546.221.1:599.323.4

РОЛЬ Na^+ , K^+ , 2Cl^- - КОТРАНСПОРТА В МЕХАНИЗМАХ ВАЗОКОНСТРИКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СЕРОВОДОРОДА

Смаглий Л.В.¹

¹ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия (634050, г. Томск, Московский тракт, 2), e-mail: lud.smagly@yandex.ru

На дезэндотелизированных сегментах аорты грудного отдела белых крыс и свежесыведенных гладкомышечных клетках того же объекта механографически и с использованием радионуклидных методов исследованы механизмы вазоконстрикторного действия донора сероводорода гидросульфид натрия. В низких концентрациях (до 100 мкМ) гидросульфид натрия вызывал увеличение механического напряжения предсокращенных в гиперкалиевом растворе сосудистых сегментов, которое устранялось ингибитором Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта буметанидом, а в высоких (500 и 1000 мкМ) – расслабление. В концентрациях до 100 мкМ гидросульфид натрия стимулировал внутрь направленный буметанид-чувствительный транспорт K^+ (^{86}Rb) в изолированных гладкомышечных клетках. Полученные данные свидетельствуют о том, что констрикторное действие малых концентраций сероводорода на сосудистые сегменты обусловлено активацией Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспорта.

Ключевые слова: сосудистые гладкомышечные клетки, сероводород, Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспорт.

ROLE OF Na^+ , K^+ , 2Cl^- - COTRANSPORT IN MECHANISMS OF VASOCONSTRICTIVE ACTION OF HYDROGEN SULFIDE

Smagly L.V.¹,

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

Mechanisms of vasoconstrictive action of the donor of hydrogen sulfide sodium hydrosulfide were investigated with a method of mechanography on endothelium-denuded segments of the white rats thoracic aorta, and with radionuclide method using freshly isolated smooth muscle cells from the same object. In low concentrations (up to 100 μM) the sodium hydrosulfide increased the mechanical tension of vascular segments precontracted with highpotassium solution, and in high concentrations (500-1000 μM) sodium hydrosulfide caused a relaxation. Sodium hydrosulfide in concentrations up to 100 μM stimulated inward-directed bumetanide-sensitive transport of ^{86}Rb in isolated smooth muscle cells. This data suggest that constrictive action of low concentrations of hydrogen sulfide on vascular segments is a consequence of activation of Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport.

Key words: smooth muscle cells, hydrogen sulfide, Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport

Молекулы сероводорода, так же как молекулы оксида азота и оксида углерода, играют важную роль в трансляции биологических сигналов. Они обладают уникальными физико-химическими свойствами и проявляют свою биологическую активность через механизмы, принципиально отличные от других сигнальных молекул [7; 8]. Во-первых, внутриклеточная передача сигналов не связана с лиганд-рецепторным мембранным взаимодействием. Во-вторых, клеточные мембраны высокопроницаемы для этих молекул и могут легко передавать сигналы аутокринным, паракринным и юкстакринным способами. В-третьих, эти молекулы проявляют свою биологическую активность путем различных взаимодействий с макромолекулами, такими как ковалентное связывание газов простетическими металлокомплексами в рецепторных белках; не ковалентное связывание с регуляторными субъединицами белков; пространственная оккупация ближайшего окружения и пространств

внутри структуры белка, что в совокупности препятствует доступу других газов в функционально критические белковые сайты.

Общепризнанным является расслабляющее действие сероводорода на кровеносные сосуды, однако дискуссионными остаются вопросы о мембранных и молекулярных мишенях, через которые реализуются такие эффекты. Большое число исследователей поддерживают версию о прямом влиянии этого газотрансмиттера на АТФ-чувствительные калиевые каналы. Расслабление сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК) при действии сероводорода связывают с гиперполяризацией мембраны, опосредованной открыванием АТФ-чувствительных калиевых каналов благодаря их сульфгидрированию на С43 [5]. В нашей лаборатории была предложена схема такого сульфгидрирования [2]. Вместе с тем ранее нами была показана критическая роль потенциал-зависимых и Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов малой и промежуточной проводимости в индуцированной сероводородом релаксации изолированных сегментов грудного отдела аорты крысы [3].

Однако нерешенным остается вопрос о возможности констрикторного действия сероводорода на гладкомышечные клетки сосудов и его вероятных механизмах. Впервые этот феномен был описан Lim J.J. [4], которая объяснила такое поведение СГМК угнетением аденилатциклазы. Вместе с тем в ее работе, а также в нашей лаборатории был выявлен ряд фактов, не укладывающихся в рамки данной гипотезы [1].

Ранее нами было показано вовлечение Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспорта в механизмы констрикторного действия фенилэфрина и ангиотензина II на СГМК. В настоящем исследовании мы изучили участие этого котранспорта в механизмах действия сероводорода на сократительную активность СГМК.

Материалы и методы

Метод механографии

Объектом исследования явились изолированные сегменты грудного отдела аорты беспородных белых крыс, которые являются традиционной моделью артериального сосуда мышечного типа. После выделения аорту помещали в физиологически сбалансированный солевой раствор Кребса, с помощью хирургических ножниц отпрепаровывали жировую и соединительную ткань и выделяли сегменты шириной 2-3 мм. Эндотелий удаляли механически, вращением деревянного манипулятора в просвете сегмента в течение 1 минуты непосредственно перед выполнением эксперимента.

Для исследования сократительной активности гладких мышц использовался метод механографии. После приготовления сегмент помещался в термостатируемую, аэрируемую камеру объемом 10 мл, заполненную физиологическим раствором Кребса, и фиксировался после предварительной нагрузки 500 мг.

Измерение механического напряжения СГМК проводили с помощью четырехканальной системы Myobath II и аппаратно-программного комплекса LAB-TRAX-4/16 (Германия), сигнал выводился на экран монитора компьютера.

Амплитуду контрольных (100%) сократительных ответов сосудистых сегментов на действие гиперкалиевого раствора (эквимолярное замещение 30 мМ NaCl на KCl) регистрировали после 40-50 минут выдерживания в нормальном растворе Кребса.

Растворы готовились на основе дистиллированной воды добавлением соответствующих реактивов (ХЧ, «Реахим», Россия). Физиологический раствор Кребса содержал (в мМ): 120.4 NaCl, 5.9 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 5.5 глюкозы, 15 C₄H₁₁O₃N [tris(oxymethyl)-aminometan] (316.4 мосМ). В растворах поддерживались значения pH 7,35—7,40 и температуры 37,0 ± 0,1 °С.

Радионуклидный метод

Для изучения внутрь направленного потока K⁺(⁸⁶Rb⁺) как маркера активности НКСС мы использовали свежeweделенные СГМК аорты крысы, которые приобретали у Lonza (Walkersville, MD, США) и использовали в 3-8 пассажах. Активность Na⁺,K⁺,2Cl⁻ - котранспорта была изучена как буметанид-чувствительный компонент входа ⁸⁶Rb. Клетки высевали в 24-луночные планшеты, промывали два раза с 2 мл аликвоты среды А, содержащей 150 мМ NaCl и 10 мМ HEPES-трис-буфера (pH 7,4). Затем среду отсасывали и добавляли 0,25 мл раствора В, содержащего 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂, 5 мМ глюкозы, 20 мМ HEPES-трис (pH 7,4) и исследуемые соединения. Через 10 мин инкубации при 37 °С с 0,25 мл среды В, содержащей 1-2 мкС/мл ⁸⁶Rb ± буметанид в концентрации 20 мкМ, поглощение изотопа была прекращено путем добавления 2 мл ледяной среды W, содержащей 100 мМ MgCl₂ и 10 мМ HEPES-трис-буфера (pH 7,4). Клетки промывали 3 раза ледяной средой W и радиоактивность среды инкубации и клеточного лизата измеряли с помощью жидкостного сцинтилляционного анализатора. Скорость входа K⁺ (⁸⁶Rb) (V, нмоль на мг белка за 10 мин) рассчитывалась как $V = A / am$, где A - радиоактивность образцов (срм), а - радиоактивность K⁺(⁸⁶Rb) в среде (срм / нмоль) и m - содержание белка измеряли с помощью модифицированного метода Лоури [6].

Результаты и обсуждение

В качестве донора сероводорода использовали гидросульфид натрия (NaHS). NaHS в концентрациях 5-1000мкМ не влиял на исходное механическое напряжение (МН) сосудистых сегментов, но в зависимости от концентрации изменял МН сосудистых гладких мышц, индуцированное гиперкалиевым (30 мМ KCl) раствором. Так, в концентрациях 5, 10, 50 и 100 мкМ NaHS увеличивал МН до 109.1±2.5%, 115.9±3.4% , 118.5±3.5%, и 127,5±5,7% (n=9, p<0.05) соответственно, от величины контрольного сокращения в гиперкалиевом

растворе. Дальнейшее увеличение концентрации NaHS до 500 и 1000 мкМ приводило к расслаблению сосудистых сегментов, предсокращенных в гиперкалиевом растворе, до $64.9 \pm 7.5\%$ и $48.3 \pm 5.0\%$ ($n=9$, $p < 0.05$) соответственно, от величины контрольного сокращения (рис. 1А).

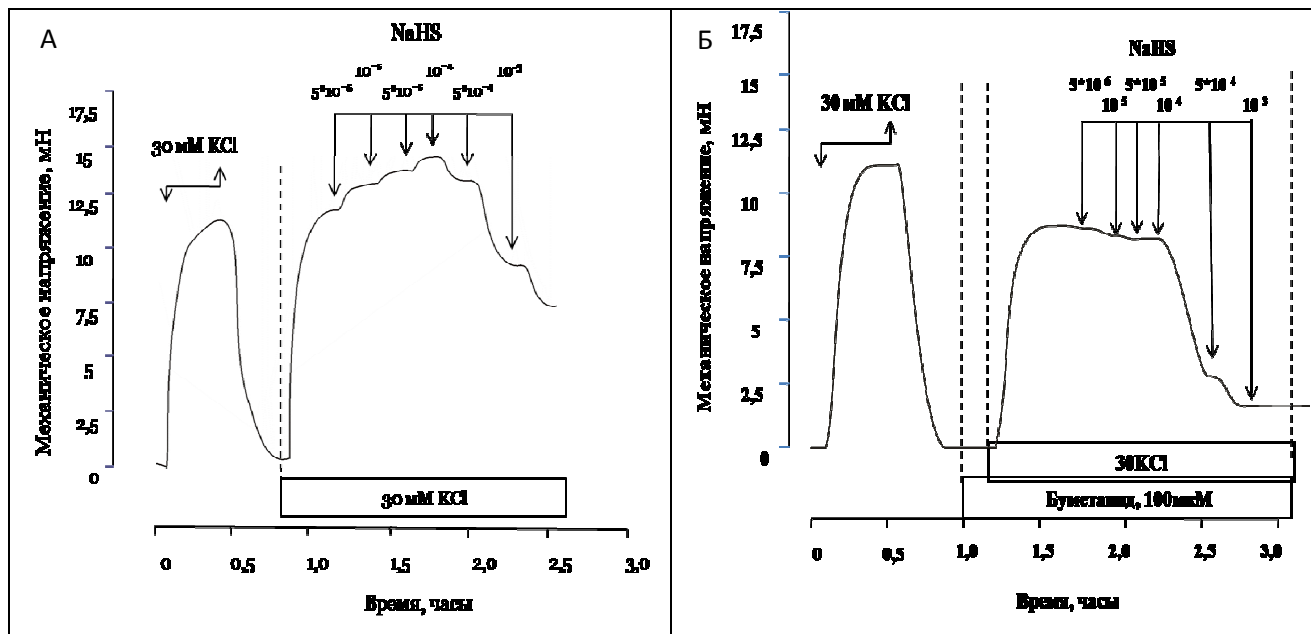


Рис. 1. Влияние сероводорода на сокращение сосудистых гладкомышечных клеток, вызванное гиперкалиевым раствором, в отсутствие (А) и в присутствии (Б) буметанида (100 мкМ). По оси ординат – механическое напряжение (мН). По оси абсцисс – время (часы).

Добавление в инкубационный раствор 100 мкМ буметанида полностью устраняло констрикторное действие NaHS. Величина релаксирующего действия 500 NaHS в данных условиях достоверно увеличилась. МН сосудистого сегмента составило в этих условиях только $19,0 \pm 4,0\%$ ($n=5$, $p < 0,05$) от величины сокращения сегментов в гиперкалиевом растворе в присутствии только буметанида; добавление 1000 мкМ NaHS дополнительного изменения МН не вызывало (рис. 1Б).

При проведении прямых измерений внутрь направленного транспорта K^+ ($^{86}Rb^+$) документирована достоверная активация NKCC при действии 50 и 100 мкМ NaHS (табл. 1).

Таблица 1

Влияние гидросульфид натрия на активность Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ - котранспорта

Добавки, мкМ	Активность Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ - котранспорта, %
--------------	---

Нет (контроль)	100
NaSH, 5	111,0±11,0
NaSH, 10	127,0±8,0
NaSH, 50	146,0±7,0*
NaSH, 100	138,0±11,0*
NaSH, 500	101,0±9,0

$X \pm m$, полученные в трех независимых экспериментах, выполненных в четырех пробах. Активность $Na^+, K^+, 2Cl^-$ - котранспорта в отсутствие NaHS принята за 100%. * - $p < 0.05$ в сравнении с контролем.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения о том, что одним из молекулярных механизмов констрикторного действия низких концентраций сероводорода в условиях предсокращения сегментов аорты гиперкалиевым раствором является активация $Na^+, K^+, 2Cl^-$ - котранспорта в СГМК

В самом деле, сероводород активировал $Na^+, K^+, 2Cl^-$ - котранспорт в свежевыделенных из грудного отдела аорты крысы гладкомышечных клетках. Ингибитор этого котранспорта буметанид устранял констрикторное действие сероводорода на изолированные сегменты того же объекта. Можно допустить, что цепь молекулярных событий, включаемая сероводородом, вовлекает активацию $Na^+, K^+, 2Cl^-$ - котранспорта, увеличение электрохимического потенциала ионов хлора, усиление входящего хлорного тока, дополнительную деполяризацию мембраны СГМК и увеличение входа Ca^{2+} .

Таким образом, в наших исследованиях установлено наличие еще одной мишени для сероводорода - $Na^+, K^+, 2Cl^-$ - котранспорта, активация которого ведет к увеличению МН артериальных сосудов.

Список литературы

1. Баскаков М.Б. Влияние сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы / М.Б. Баскаков, С.В. Гусакова, А.С. Желудева и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 6. – С. 12-17.
2. Баскаков М.Б. Газовая атака, или Осторожно, газы! / М.Б. Баскаков, М.С. Юсубов // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. - № 6. – С. 160-164.

3. Baskakov M. Mechanisms of regulation of gasotransmitters contractile activity of smooth muscles cells / M. Baskakov, S. Gusakova, A. Zheludeva, L. Smagly, S. Orlov // Journal of Hypertension. – V. 30. – P. 366.
4. Lim J.J. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells / J. J. Lim, Y. - H. Liu, E. S. Win Khin, J. - S. Bian // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2008. – 295. – P. 1261-1270.
5. Mustafa A.K. H₂S signals through protein S-sulfhydration / A.K. Mustafa, M.M. Gadalla, N. Sen et al // Sci. Signal. - 2009. - V. 2. - ra72.
6. Orlov S.N. NKCC1 as a regulator of vascular tone and a novel target for antihypertensive therapeutics // American Journal of Physiology. – 2007. – V. 292. - № 5. – P. H2035-H2036.
7. Suematsu M. Quartet signal transducers in gas biology // Antioxid Redox Signal. – 2003. - 5(4). – P. 435-437.
8. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? // FASEB J. – 2002. - 16. – P. 1792-1798.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашения № 8487 «Гипоксия как фактор регуляции транскриптома и сократительных свойств кровеносных сосудов» и № 16.512.11.2282 «Разработка технологических основ защиты клеток при гипоксии с использованием идентификации редокс-зависимых молекулярных мишеней управления ион-транспортующими системами».

Рецензенты:

Носарев Алексей Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения 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.