

## Влияние сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы

*Баскаков М.Б.<sup>1</sup>, Гусакова С.В.<sup>1</sup>, Желудева А.С.<sup>1</sup>, Смазлий Л.В.<sup>1</sup>, Ковалёв И.В.<sup>1</sup>, Вторушина Т.А.<sup>1</sup>, Носов Д.С.<sup>1</sup>, Ерёмченко К.В.<sup>1</sup>, Медведев М.А.<sup>1</sup>, Орлов С.Н.<sup>2</sup>*

## Effect of hydrogen sulfide on the contractile activity of smooth muscle cells from the rat aorta

*Baskakov M.B., Gusakova S.V., Zheludeva A.S., Smagly L.V., Kovalyov I.V., Vtorushina T.A., Nosov D.S., Yeryomenko K.V., Medvedev M.A., Orlov S.N.*

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия

<sup>2</sup> Лаборатория Научно-исследовательского центра Университета г. Монреаля, Канада

© Баскаков М.Б., Гусакова С.В., Желудева А.С. и др.

На препаратах аорты крысы, используемой в качестве модели артерии мышечного типа, методом механографии изучено влияние сероводорода на сокращения изолированных дезидентифицированных сегментов сосуда. Установлено, что сероводород в концентрациях 1—50 мкмоль повышает механическое напряжение гладкой мышцы, предсокращенной гиперкалиевым раствором. В более высоких концентрациях (300—1 000 мкмоль) H<sub>2</sub>S ведет к снижению амплитуды гиперкалиевой контрактуры. Сокращения гладкомышечных клеток, вызванные α<sub>1</sub>-адреномиметиком фенилэфрином, угнетаются при действии сероводорода во всем диапазоне концентраций. Обсуждаются причины различия полученных данных с результатами исследований других лабораторий и возможные механизмы влияния сероводорода на сократительную активность сосудистых гладких мышц.

**Ключевые слова:** гладкомышечные клетки, газотрансмиттеры, сероводород.

In preparations of rat aorta, used as a model of muscular type arteries, the method mehanografii studied the effect of hydrogen sulfide on the reduction of isolated of vascular smooth muscle. Found that hydrogen sulfide in concentrations 1—50 mmol increases the mechanical stress of smooth muscle in high-K<sup>+</sup> medium. At higher concentrations (300—1 000 mmol) H<sub>2</sub>S leads to lower amplitude giperkalievoy contraction in high-K<sup>+</sup> medium. Reduction of smooth muscle cells caused by phenylephrine inhibited the action of hydrogen sulfide in the whole range of concentrations. The causes of differences in data obtained with the results of studies in other laboratories, and possible mechanisms of action of hydrogen sulfide on the contractile activity of vascular smooth muscle.

**Key words:** smooth muscle cells, gasotransmitter, hydrogen sulfide.

УДК 591.413:591.861].044: 546.221.1:599.323.4

### Введение

За последние 30 лет произошли события, которые, без преувеличения, потрясли научную общественность. В 1987 г. была открыта сигнальная роль простого газа оксида азота NO. Однако S. Moncada сделал гораздо больше, чем идентифицировал NO как эндотелиальный расслабляющий фактор, за что был удостоен Нобелевской премии. Его главной заслугой было открытие принципиально отличного способа трансляции сигналов в клетках, не связанного с лиганд-

рецепторным взаимодействием. Развитие этого направления привело к признанию существования рецепторнезависимых сигнальных механизмов и заставило пересмотреть ставшую традиционной доктрину о внутриклеточной передаче сигналов. В этом, по видимому, кроется причина более лояльного отношения ученого мира к установлению сигнальной функции оксида углерода. Но менее чем через десятилетие был обнаружен еще один внутриклеточный посредник — сероводород H<sub>2</sub>S, и этот газотрансмиттер оказался

наиболее загадочным и функционально наиболее значимым газовым посредником [8].

Сероводород, хорошо известный токсичный газ, в клетках млекопитающих эндогенно продуцируется тремя ферментами (цистотионин- $\beta$ -синтазой, цистотионин- $\gamma$ -лиазой и 3-меркаптопируват-сульфуртрансферазой) и играет важную роль в физиологических условиях и при патологических состояниях [1, 6, 7]. В центральной нервной системе сероводород функционирует как нейромодулятор, но может выполнять и протекторную функцию при оксидативном стрессе. Установлено благотворное влияние доноров сероводорода при гемморагическом шоке, эндотоксемии, бактериальном сепсисе и асептическом воспалении [5].

В сердечно-сосудистой системе сероводород ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток (ГМК), модулируя MAP-киназный сигнальный путь [4].  $H_2S$  эффективно расслабляет гладкие мышцы кишечника, интактные и деэнтотелизированные сосудистые сегменты, активируя аденозинтрифосфат-чувствительные калиевые каналы ГМК или  $Ca^{2+}$ -зависимые калиевые каналы большой проводимости и потенциалзависимые аминопиридин-чувствительные калиевые каналы [2, 9, 10]. По данным S. Kubo, сероводород может вызывать и сокращение сегментов аорты крысы через изменение внутриклеточной концентрации циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) или активацию  $Cl/HCO_3$  обменника и ацидификацию цитоплазмы ГМК [3].

Эти сосудистые эффекты имеют существенное значение для поддержания артериального давления, предотвращения ремоделирования сосудов и позиционируют гидросульфид как истинный газотрансмиттер и важный патогенетический фактор при гипертонии и ишемически-реперфузионных поражениях жизненно важных органов.

За десятилетие, прошедшее с момента публикации результатов первых исследований, накоплено большое количество экспериментальных данных о влиянии сероводорода на тонус различных сосудов, которые, однако, весьма противоречивы, нуждаются в уточнении как самой феноменологии влияния этого газа на артериальные сосуды мышечного типа, так и в анализе возможных механизмов его действия на базальный и индуцированный предсокращающими факторами

тонус гладких мышц кровеносных сосудов. Решению этих задач и посвящена настоящая работа.

Цель исследования — изучение влияния сероводорода на сократительные свойства гладкомышечных клеток.

## Материал и методы

Исследования проведены на интактных и деэнтотелизированных гладкомышечных сегментах аорты беспородных белых крыс, которая является традиционной, хорошо апробированной моделью артериального сосуда мышечного типа. Для исследования сократительной активности после предварительной нагрузки 500 мг сегменты фиксировались в термостатируемой перфузионной камере в условиях постоянной перфузии раствором Кребса (1 мл/мин). Изменение механического напряжения ГМК передавалось на шток механоэлектрического преобразователя 6МХ2Б (г. Москва) и после усиления регистрировалось с помощью XY рекодера (Carl Zeiss Jena, Германия).

Амплитуду контрольных (100%-х) сократительных ответов сосудистых сегментов на гиперкалиевый раствор (замена 30 ммоль NaCl на KCl) или фенилэфрин (10 мкмоль) регистрировали после 40—50 мин выдерживания в нормальном растворе Кребса.

Растворы для перфузии препаратов готовились на основе дистиллированной воды добавлением соответствующих реактивов (ХЧ, «Реахим», Россия). Физиологический раствор Кребса содержал (ммоль): 120,4 NaCl, 5,9 KCl, 2,5  $CaCl_2$ , 1,2  $MgCl_2$ , 5,5 глюкозы, 15  $C_4H_{11}O_3N$  [tris(oxymethyl)-aminometan] (316,4 мосМ). В растворах поддерживались значения pH 7,35—7,40 и температуры ( $37,0 \pm 0,1$ ) °C.

Тестирующие растворы готовились путем добавления в раствор Кребса соответствующих реактивов: гидросульфида натрия, форсколина, фенилэфрина (все производства Sigma, США) и тетраэтиламмония хлорида (Serva).

Результаты представлены как среднее арифметическое  $M$  и среднеквадратичное отклонение  $\sigma$  и обработаны с помощью программного пакета Statistica 6.0 for Windows с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни или  $t$ -критерия Стьюдента для зависимых образцов ( $t$ -test for dependent samples). Достоверными считали различия при значении  $p < 0,05$ .

## Результаты

После 40 мин инкубации в нормальном растворе Кребса в ответ на гиперкалиевый раствор регистрировались типичные для ГМК аорты крысы сокращения (рис. 1). При добавлении в перфузионный раствор Кребса донора  $H_2S$  — гидросульфида натрия NaHS в концентрациях 1—1 000 мкмоль исходное механическое напряжение (МН) ГМК не изменялось. На фоне поддерживаемого гиперкалиевого сокращения NaHS (5, 10, 50 мкмоль) вызывал дозозависимое увеличение МН сегментов. Однако добавление NaHS в концентрациях 300—1 000 мкмоль приводило к дозозависимому расслаблению гладкомышечных препаратов, предсокращенных гиперкалиевым раствором (рис. 1). Концентрация NaHS, равная 100 мкмоль, являлась переходной, и его действие реализовывалось или в виде сокращения, или расслабления.

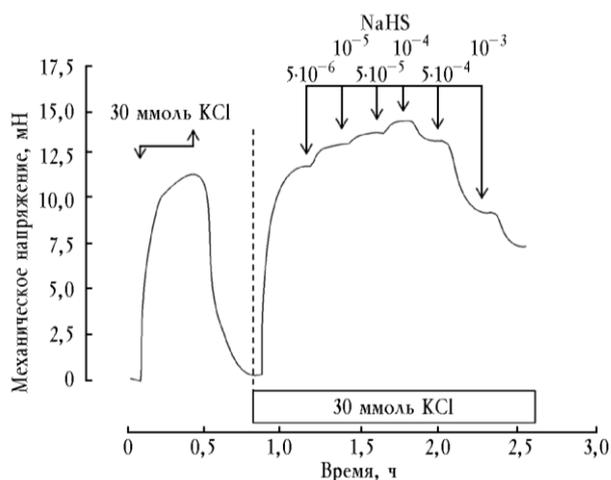


Рис. 1. Влияние гидросульфида натрия на механическое напряжение гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым (30 ммоль KCl) раствором. Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов

В дальнейшей работе были выбраны концентрации NaHS, на порядок отличающиеся от переходной концентрации. Для изучения сократительного действия сероводорода применяли NaHS в концентрации 10 мкмоль, а для изучения расслабляющего влияния — в концентрации 1 ммоль. При перфузии указанными концентрациями механическое напряжение сосудистого сегмента составило  $(119,1 \pm 3,1)\%$  ( $n = 14$ ;  $p < 0,05$ ) и  $(48,4 \pm 14,2)\%$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) соответственно от контрольного гиперкалиевого сокращения.

Для исследования ионных механизмов действия NaHS использовали блокатор  $Ca^{2+}$ -активируемых и потенциалзависимых калиевых каналов тетраэтиламоний (ТЭА).

Добавление 10 ммоль тетраэтиламония в раствор Кребса не влияло на исходный уровень МН гладкомышечных клеток и не изменяло амплитуду гиперкалиевого (30 ммоль KCl) сокращения. На фоне ТЭА активирующее действие NaHS (10 мкмоль) статистически значимо не изменялось, тогда как расслабление (1 ммоль NaHS) угнеталось: МН составило  $(76,6 \pm 10,9)\%$  от контрольного гиперкалиевого сокращения по сравнению с  $(48,4 \pm 14,2)\%$  в отсутствие ТЭА.

Известно, что цАМФ играет ключевую роль в расслаблении гладких мышц в ответ на стимуляцию  $\beta$ -адренорецепторов. Для увеличения внутриклеточной концентрации цАМФ использовали активатор аденилатциклазы дитерпен форсколин, который вызывал дозозависимое расслабление гладкомышечных сегментов, предсокращенных гиперкалиевым раствором. Форсколин в концентрациях 0,5; 1 и 10 мкмоль вызывал снижение величины МН до  $(70,3 \pm 4,3)$ ;  $(49,7 \pm 7,8)$  и  $(37,8 \pm 3,9)\%$  ( $n = 12$ ;  $p < 0,05$ ) соответственно от контрольного гиперкалиевого сокращения. Таким образом, полумаксимальное снижение механического напряжения гладкомышечного препарата, предсокращенного гиперкалиевым раствором, происходило при добавлении форсколина в концентрации 1 мкмоль.

На фоне действия форсколина (0,5; 1 и 10 мкмоль) эффект NaHS в концентрации 10 мкмоль («возбуждающая концентрация») менялся на противоположный: развивалось дополнительное расслабление сосуда, величина которого составила  $(85,1 \pm 6,4)$ ;  $(85,3 \pm 2,3)$  и  $(73,2 \pm 9,7)\%$  ( $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ) соответственно от величины МН в присутствии форсколина.

В то же время предобработка форсколином (0,5; 1 мкмоль) не оказывала статистически значимого влияния на действие 1 ммоль NaHS («расслабляющая концентрация») при гиперкалиевом сокращении. При действии 10 мкмоль форсколина релаксирующий эффект NaHS (1 ммоль) в части экспериментов не изменялся  $(56,3 \pm 3,0)\%$ ,  $n = 6$ , а в половине случаев усиливался  $(3,0 \pm 2,7)\%$ ,  $n = 6$ ;  $p < 0,05$ .

Сократительные ответы сосудистых гладких мышц инициируются многими физиологически активными веществами. Для изучения механизмов

влияния сероводорода на сократительную активность ГМК аорты крысы, вызванную стимуляцией  $\alpha_1$ -адренергических рецепторов, применяли фенилэфрин (ФЭ).

Амплитуда сокращений в ответ на добавление 10 мкмоль ФЭ в раствор Кребса была сравнима с ответной реакцией ГМК на действие контрольного гиперкалиевого (30 ммоль KCl) раствора.

На фоне действия фенилэфрина NaHS (1—1 000 мкмоль) разнонаправленно влиял на величину МН гладкомышечных сегментов аорты крысы.

В концентрациях 1, 5, 100 и 1 000 мкмоль NaHS приводил к снижению силы ФЭ-индуцированных сокращений гладкомышечных сегментов аорты крысы до (84,0 ± 4,2); (67,9 ± 2,6); (47,9 ± 5,5) и (24,5 ± 7,3)% ( $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ) соответственно от контрольного сокращения (рис. 2). При действии 10 мкмоль NaHS в части случаев наблюдалось снижение величины МН до (70,0 ± 6,8)% ( $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ), однако в ряде экспериментов механическое напряжение гладкомышечных клеток не изменялось или наблюдалась тенденция к его увеличению до (104,6 ± 4,4)% ( $n = 3$ ;  $p > 0,05$ ) от контрольного сокращения.

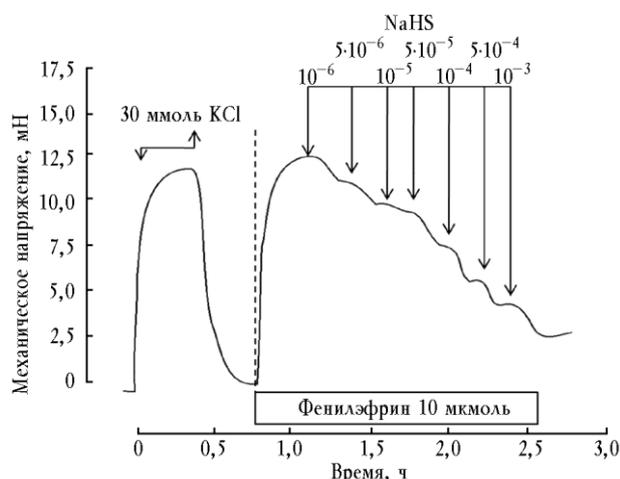


Рис. 2. Влияние гидросульфида натрия на механическое напряжение гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного фенилэфрином (10 мкмоль). Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов

Добавление блокатора калиевых каналов тетраэтиламмония в концентрации 10 ммоль в раствор Кребса приводило к увеличению амплитуды сократительного ответа на действие фенилэфрина (10 мкмоль), но статистически значимо не изменяло расслабляющее влияние NaHS (100 мкмоль). На фоне

угнетения калиевой проводимости мембраны ГМК МН составило (60,8 ± 10,3)% ( $n = 6$ ) от ФЭ-индуцированного сокращения в присутствии ТЭА.

Активатор аденилатциклазы форсколин (0,01—10 мкмоль) вызывал дозозависимое снижение величины МН гладкомышечного сегмента аорты крысы, предсокращенного фенилэфрином (10 мкмоль). Расслабляющее действие, близкое к полумаксимальному, форсколин оказывал при концентрации 0,1 мкмоль: величина МН составила (62,5 ± 8,8)% ( $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения.

На фоне действия 0,1 мкмоль форсколина NaHS (100 мкмоль) не оказывал значимого эффекта на механическое напряжение сосудистых сегментов, предсокращенных фенилэфрином. Расслабляющий эффект 1 ммоль NaHS потенцировался: МН составило (15,3 ± 7,4)% ( $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ) от ФЭ-индуцированного сокращения.

## Обсуждение

Среди молекул, выполняющих в клетках сигнальную функцию, в последнее время большое внимание привлекают к себе газотрансммиттеры, и в частности сероводород. Зависимость между уровнем содержания  $H_2S$  в плазме крови, тканях и клетках и развитием различных заболеваний, протекторное действие при ишемически-реперфузионных повреждениях жизненно важных органов позволяют считать этот газ важным звеном патогенеза многих заболеваний центральной нервной и сердечно-сосудистой систем. Изучение механизмов влияния  $H_2S$  на функциональную активность клеток может иметь значение не только с позиции фундаментального знания о принципах регуляции поведения клеток и механизмах внутриклеточной коммуникации, но и с точки зрения его терапевтической и профилактической значимости.

При исследовании влияния  $H_2S$  на сократительную активность сосудистых гладкомышечных клеток было установлено его разнонаправленное действие на сокращения, индуцированные как деполяризацией мембраны ГМК гиперкалиевым раствором, так и стимуляцией  $\alpha_1$ -адренорецепторов фенилэфрином. Если NaHS в диапазоне концентраций 1—50 мкмоль вызывал увеличение МН гладкомышечных сегментов, предсокращенных гиперкалиевым раствором, то при более высоких концентрациях он, напротив, вызывал расслабление. При фенилэфрининдуцированном со-

крашении каждая из концентраций NaHS во всем выбранном их диапазоне вызвала уменьшение величины МН.

Такая картина ответной реакции на действие H<sub>2</sub>S может быть связана с доминированием отдельных внутриклеточных сигнальных систем при этих способах индукции сокращений ГМК. В частности, в сокращение, вызванное ФЭ, вовлечены рецепторуправляемые Ca<sup>2+</sup>-каналы и С-киназная цепь кальциевой сигнальной системы. Пока нет данных о влиянии сероводорода на эти молекулярные каскады, включаемые стимуляцией α<sub>1</sub>-адренорецепторов.

Одним из механизмов реализации релаксирующего эффекта H<sub>2</sub>S является активация калиевой проводимости мембраны. В представленных экспериментах с использованием неизбирательного блокатора калиевых каналов ТЭА было получено, что на фоне его действия в случае гиперкалиевого сокращения происходило ослабление расслабляющего влияния NaHS, а при сокращении, индуцированном фенилэфрином, значимых изменений расслабляющего действия NaHS не наблюдалось.

Основной механизм расслабления сосудистых гладких мышц связывают с активацией K<sup>+</sup>(АТФ)-каналов и гиперреполяризацией мембраны ГМК [10]. Вместе с тем в литературе имеются данные о вовлечении Ca<sup>2+</sup>-активируемого и потенциалзависимого калиевого тока в реализацию расслабляющего действия сероводорода [4]. Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями об участии К(Са)- и (или) потенциалзависимых каналов в реализацию расслабляющего действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы.

Как указано выше, при изучении концентрационной зависимости действия донора сероводорода на деэндотелизированные сегменты аорты крысы было установлено констрикторное действие этого газа при концентрациях NaHS 10<sup>-5</sup>—10<sup>-4</sup> моль и расслабляющее влияние сероводорода при повышении его содержания в растворе. Указанный факт не описан ни в одной из работ известной своими достижениями в области газовой коммуникации лаборатории доктора Вонга (2002—2010), однако подмечен в экспериментах Jia Jia Lim [4], но объяснение этого возбуждающего действия сероводорода угнетением цАМФ-опосредованной сигнальной системы ГМК не нашло подтверждения в настоящих экспериментах с форсколином. Изучение и обсуждение возможных

причин таких разногласий в самой феноменологии дозозависимых эффектов сероводорода и механизмах возбуждающего действия этого газа в случае его подтверждения третьей стороной являются предметом отдельного исследования.

## Заключение

Многочисленные исследования свидетельствуют о множественных эффектах сероводорода. В отличие от других фармакологических агентов H<sub>2</sub>S активирует многие сигнальные пути одновременно. По-видимому, сероводород обладает всеми положительными воздействиями оксида азота на клетки, но без способности образовывать токсичные метаболиты. Более того, сероводород нейтрализует ONO<sub>2</sub>. Важно отметить, что авторы наблюдали значительные перекрестные влияния между H<sub>2</sub>S и NO, и этот аспект также должен находиться в поле зрения. Возможно, и даже скорее всего, H<sub>2</sub>S не только оказывает прямое действие в своем собственном оперативном пространстве в соответствии с доминирующими точками воздействия, но также влияет на другие органы и системы косвенно, за счет взаимодействия с системами L-аргинин/NO и HO/CO.

Следовательно, можно предполагать наличие суперсистемы L-аргинин/NOS/NO — HO/CO — L-Cys/CSE/H<sub>2</sub>S.

В этой связи большое значение имеют создание, экспериментальные и параклинические исследования ингибиторов синтеза сероводорода и препаратов, выступающих в качестве агентов-доноров «медленного освобождения» (SR) H<sub>2</sub>S с заданной фармакодинамикой и фармакокинетикой, обладающих минимальной токсичностью на клетки в культуре или изолированные органы или, наконец, на организм в целом. Создание такого арсенала — задача первостепенной важности.

*Исследование выполнено в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009—2013 гг.» «Проведение научных исследований коллективами под руководством приглашенных исследователей» (ГК № 02.740.11.5031) и «Проведение научных исследований под руководством кандидатов наук» (ГК П445).*

## Литература

1. Deiffenstein R.J., Hulbert W.C., Roth S.H. Toxicology of hy-

- drogen sulfide // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1992. № 32. P. 109—134.
2. *Jang G., Wu L., Liang W., Wang R.* Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells // *Mol. Pharmacol.* 2005. № 68. P. 1757—1764.
  3. *Kubo S., Doc I., Kurokawa Y. et al.* Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension // *Toxicology.* 2007. № 232. P. 132—146.
  4. *Lim J.J., Liu Y.-H., Win Khin E.S., Bian J.-S.* Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2008. № 295. P. 1261—1270.
  5. *Lowicka E., Beltowski J.* Hydrogen sulfide — the third gas of interest for pharmacologists // *Pharmacol. Reports.* 2007. № 59. P. 4—24.
  6. *Szabo C.* Hydrogen sulfide and its therapeutic potential // *Nature Reviews.* 2007. № 6. P. 917—935.
  7. *Wagner C.A.* Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator // *J. of Nephrology.* 2009. № 22 (2). P. 173—176.
  8. *Wang R.* The gasotransmitter role of hydrogen sulfide // *Antioxid Redox Signal.* 2003. № 5. P. 493—501.
  9. *Webb G.D., Lim L.H., Oh V.M.S. et al.* Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery // *JPET.* 2008. № 324 (2). P. 876—882.
  10. *Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R.* The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener // *The EMBO Journal.* 2001. № 20 (21). P. 6008—6016.

Поступила в редакцию 09.09.2010 г.

Утверждена к печати 28.09.2010 г.

#### Сведения об авторах

**М.Б. Баскаков** — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

**С.В. Гусакова** — канд. мед. наук, доцент кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

**А.С. Желудева** — аспирант кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

**Л.В. Смазлий** — аспирант кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

**И.В. Ковалёв** — д-р мед. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

**Т.А. Вторушина** — студентка 6-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

**Д.С. Носов** — студент 5-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

**К.В. Ерёмченко** — студент 6-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

**М.А. Медведев** — д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).

**С.Н. Орлов** — д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией Научно-исследовательского центра Университета г. Монреаля (Канада).

#### Для корреспонденции

**Светлана Валерьевна Гусакова**, тел. (3822) 42-09-54; e-mail: gusacova@yandex.ru