

На правах рукописи

Смаглий Людмила Вячеславовна

**РОЛЬ СЕРОВОДОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК**

03.03.01. – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Томск – 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет министерства здравоохранения Российской Федерации»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Баскаков Михаил Борисович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор, заведующий Центральной
научно-исследовательской лабораторией
ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

Байков Александр Николаевич

доктор медицинских наук,
профессор, профессор
кафедры медико-биологических
дисциплин
ФБОУ ТГПУ Минобрнауки РФ

Яхонтов Сергей Владиславович

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.

Защита состоится " ____ " _____ 2013 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (634050 г. Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан " ____ " _____ 2013 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета



Петрова И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Сероводород (H_2S) наряду с другими газообразными сигнальными молекулами, такими как монооксид азота и монооксид углерода, относят к группе газотрансмиттеров. Он, как и другие газовые посредники, свободно проникает через плазматическую мембрану и включает внутриклеточную сигнализацию рецептор-независимым способом [Suematsu, 2003].

H_2S вовлечен в процессы как внутриклеточной, так и межклеточной коммуникации и участвует в регуляции большого числа клеточных функций, включая сосудистый тонус [Zhao W., Wang R., 2002], работу центральной нервной системы [Abe K., Kimura H., 1996], воспаление [Lowicka E., Beltowski J., 2007], пролиферацию, дифференцировку, гибель клеток [Yang G. et al., 2004] и др. В то же время механизмы оперирования H_2S как сигнальной молекулы остаются недостаточно изученными. Общеизвестным является сосудорасслабляющее действие сероводорода, однако нерешенными остаются вопросы о мембранных и молекулярных мишенях, через которые реализуются такие эффекты. Расслабление мембраны сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК) при действии сероводорода связывают с активацией АТФ-чувствительных K^+ -каналов (K_{ATP}), гиперполяризацией мембраны и уменьшением потенциал-зависимого входа Ca^{2+} [Mancardi D et al., 2009; Leffler CW et al., 2011].

Значительно менее изучено влияние сероводорода на другие системы трансмембранного переноса ионов. Так, по некоторым данным, H_2S активировать калиевые каналы, чувствительные к 4-аминопиридину [Cheang W.S. et al., 2010], Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы малой (SK_{Ca}) и промежуточной проводимости (IK_{Ca}) [Wang R., 2011], потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы L-типа [Tian XY et al, 2012], Cl^-/HCO_3^- - обменник [Liu Y-H, Bian J-S., 2011].

Спорным остается вопрос о возможности и механизмах констрикторного действия сероводорода. Возбуждающее действие сероводорода на СГМК было

описано в работе J.J. Lim (2008), которая объяснила этот феномен снижением внутриклеточного содержания цАМФ вследствие ингибирования сероводородом аденилатциклазы (АЦ).

Резюмируя изложенное, можно заключить, что, несмотря на довольно многочисленные исследования действия сероводорода на сократительную активность сосудистых гладких мышц (СГМ), многие вопросы не нашли удовлетворительного решения. Это касается как самих эффектов, вызываемых H_2S в СГМК, так и мембранных механизмов, вовлекаемых этим газотрансмиттером в реализацию своего действия.

Цель исследования: Исследовать влияние и механизмы действия сероводорода на сократительную активность сосудистых гладких мышц.

Задачи исследования

1. Исследовать действие донора H_2S гидросульфида натрия на механическое напряжение сосудистых гладких мышц аорты крысы, индуцированное деполяризацией мембраны гиперкалиевым раствором Кребса.
2. Изучить эффекты гидросульфида натрия в сосудистых гладких мышцах аорты крысы, предсокращенных стимуляцией α_1 -адренергических рецепторов.
3. Определить вклад Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ –котранспорта в механизмы действия сероводорода на механическое напряжение гладких мышц аорты крысы.
4. Установить роль изменений калиевой проводимости мембраны в механизмах действия H_2S на сократительную активность сосудистых гладкомышечных клеток.

Положения, выносимые на защиту

1. Действие сероводорода на гладкомышечные клетки аорты крысы разнонаправлено и зависит от концентрации и природы предсокращения сосудистых гладких мышц. При сокращении, индуцированном деполяризацией мембраны в гиперкалиевом растворе Кребса, сероводород в малых (до 100 мкМ) концентрациях увеличивает механическое напряжение изолированных сегментов аорты, а при повышении концентрации - вызывает расслабление последних. В сосудистых гладких мышцах, предсокращенных фенилэфрином,

сероводород во всех использованных концентрациях вызывает дозозависимое расслабление.

2. Одной из ключевых мишеней сероводорода является Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспортер, через активацию которого реализуется констрикторное действие этого газотрансмиттера на гладкие мышцы аорты крысы.

3. В основе релаксирующего действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы лежит увеличение калиевой проводимости мембраны: в СГМК, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, главным образом, за счет кальций-активируемого, а при предсокращении, индуцированном возбуждением α_1 -адренорецепторов, - АТФ-чувствительного ее компонентов.

Научная новизна. Установлено разнонаправленное действие сероводорода на механическое напряжение сосудистых гладкомышечных клеток аорты крысы. Впервые идентифицирована новая мишень - Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспортер, который вовлечен в механизмы регуляции сероводородом сократительной активности сосудистых гладких мышц, и продемонстрирована его роль как ключевого эффектора вазоконстрикторного действия сероводорода. Установлено, что открывание кальций-активируемых калиевых каналов малой и промежуточной проводимости мембраны сосудистых гладкомышечных клеток является основным механизмом релаксации гладких мышц аорты крысы, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, а открывание АТФ-чувствительных калиевых каналов – расслабления СГМК, предсокращенных фенилэфрином.

Научно-практическая значимость. Результаты исследования являются вкладом в развитие фундаментальных знаний о механизмах внутриклеточной коммуникации. Определены механизмы констрикторного и релаксирующего действия газового посредника H_2S . Полученные данные дополняют сведения о механизмах регуляции тонуса кровеносных сосудов газотрансмиттерами. Результаты исследования могут быть использованы при разработке молекулярных технологий управления поведением клеток путем модификации газовой коммуникации в СГМК, местной профилактики спастических

состояний и рестеноза сосудистых трансплантатов. Сформулированные в работе положения используются в курсах лекций и практических занятиях, проводимых на кафедрах биофизики и функциональной диагностики, нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета. Полученные данные и методические приемы используются в научных исследованиях, проводимых на кафедрах биофизики и функциональной диагностики, нормальной физиологии Сибирского государственного медицинского университета. Области применения полученных данных: физиология, биофизика, фармакология.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 102 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав: «Обзор литературы», «Материал и методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», заключения. Библиография включает 222 ссылок, в том числе 43 – работы отечественных авторов и 179 – зарубежных. Работа иллюстрирована 12 рисунками и 3 таблицами.

Апробация работы. Основные результаты диссертации обсуждены на всероссийских и международных конгрессах: 74-я итоговая студенческая научно – практическая конференция с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения профессора А.М. Дыхно (Красноярск, 2010), Всероссийская 69-я итоговая научная студенческая конференция, посвященная 200-летию со дня рождения Н.И. Пирогова (Томск, 2010), XI конгресс молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2010), V Международная научная конференция «Психофизиологические и висцеральные функции в норме и патологии», посвященная 100 - летию со дня рождения профессора Павла Дмитриевича Харченко и 65-летию НИИ физиологии имени Петра Богача (Киев, 2010), 21st European meeting on hypertension and cardiovascular prevention (Milan, 2011), 22nd European meeting on hypertension and cardiovascular prevention (London, 2012).

Исследования поддержаны грантами федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-

2013 годы: «Разработка технологических основ селективного управления внутриклеточной газовой сигнализацией» (государственный контракт № 02.740.11.5031 от 20.06. 2009 г.), «Селективная модуляция внутриклеточной коммуникации как основа молекулярных технологий управления функциями клеток» (государственный контракт № 14.740.11.0932 от 12.04.2011 г.), «Гипоксия как фактор регуляции транскриптома и сократительных свойств кровеносных сосудов» (соглашение 8487 от 23.10.2012 г.).

Личное участие автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке идеи и планировании исследования, анализировал литературу. Автором выполнена экспериментальная часть работы, проведена статистическая обработка полученных данных и интерпретация результатов.

По теме диссертации опубликовано 12 работ, из которых 4 – в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты крысы методом механографии. Исследование проводилось 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 и принимали за 100%. В экспериментах с использованием в качестве предсокращающего фактора фенилэфрина (ФЭ) амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от амплитуды контрольного ФЭ-индуцированного сокращения (10 мкМ).

Относительный вклад эффекта блокирования *i*-тых калиевых каналов определяли как отношение расслабления сосудистых сегментов в присутствии блокатора *i*-тых каналов к сумме расслаблений СГМ в присутствии каждого из блокаторов калиевых каналов, согласно формуле [Лисенков А.Н., 1979]:

, где ΔP_i – величина

расслабления сосудистых сегментов (%) при действии NaHS в концентрации, близкой к EC_{50} , в присутствии блокатора исследуемых каналов, P_i – величины расслабления (%) в присутствии каждого из используемых блокаторов. Чем меньше относительная величина расслабления сосудистых сегментов в присутствии блокатора данного типа каналов, тем больше степень участия этих каналов в механизмах расслабляющего действия сероводорода.

Изучение активности Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ - котранспорта радионуклидным методом. Исследование проводилось на свежесыводенных СГМК аорты крысы, которые использовали в 3-8 пассажах (Lonza, Walkersville, MD, США). Активность Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -котранспорта (NKCC) изучали как буметанид-чувствительный компонент входа $^{86}Rb^+$. Радиоактивность среды инкубации и клеточного лизата измеряли с помощью жидкостного сцинтилляционного анализатора. Скорость входа K^+ ($^{86}Rb^+$) (V (нмоль на мг белка за 10 мин)) рассчитывалась как $V=A/am$, где A - радиоактивность образцов (срм), a - радиоактивность K^+ ($^{86}Rb^+$) в среде (срм/нмоль) и m - содержание белка)

измеряли с помощью модифицированного метода Лоури [Orlov S.N. et al., 1996].

Используемые реактивы. 4-аминопиридин (Sigma); гидросульфид натрия (Sigma); глибенкламид (Sigma); тетраэтиламмония хлорид (Serva); фенилэфрин (Sigma); форсколин (Sigma); харибдотоксин (Sigma), буметанид (Sigma), $^{86}\text{RbCl}$ (Perkin Elmer, Waltman, MA, USA).

В качестве донора сероводорода использовали гидросульфид натрия (NaHS). Раствор NaHS готовили непосредственно перед использованием, pH раствора поддерживали в пределах 7.35-7.40.

Статистическая обработка. Анализ данных проводили при помощи программы Statistica 7.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде «среднее \pm ошибка среднего» ($X \pm m$). Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий нормальности Колмогорова-Смирнова. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Для проверки однородности двух зависимых выборок был использован T-критерий Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Достоверность различий определялась при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование влияния сероводорода на сократительную активность гладких мышц аорты крысы. NaHS в концентрациях 5-1000 мкМ не влиял на исходное МН гладких мышц аорты. Гиперкалиевый раствор Кребса (30 мМ KCl) приводил к развитию поддерживаемого сократительного ответа. NaHS в концентрациях 5, 10, 50 мкМ вызывал увеличение МН сосудистых ГМ на 9.1 ± 2.5 %, 15.9 ± 3.4 % и 18.5 ± 3.5 %, соответственно ($n=9$, $p < 0.05$). При действии 100 мкМ NaHS наблюдался двухфазный ответ СГМК: транзиторное увеличение МН на 27.5 ± 5.7 % с последующим его снижением на 15.3 ± 2.4 % ($n=9$, $p < 0.05$). NaHS в концентрациях 500 и 1000 мкМ снижал МН на 35.1 ± 7.5 % и 51.7 ± 5.0 % ($n=9$, $p < 0.05$), соответственно, от величины контрольного сокращения в гиперкалиевом растворе Кребса (Рис.1А).

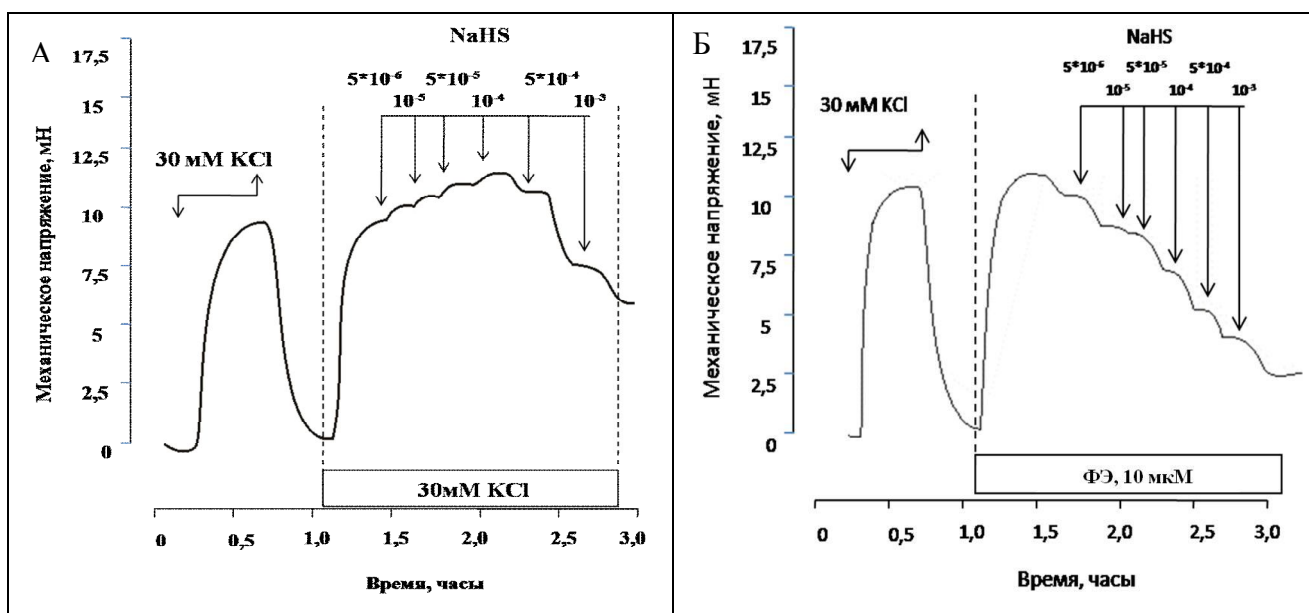


Рис. 1. Влияние NaHS (5-1000 мкМ) на механическое напряжение гладкомышечных сегментов аорты крысы, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса (А) и фенилэфрином (Б). По оси ординат – механическое напряжение (мН). По оси абсцисс – время (часы).

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 ± 4.1 %, 17.0 ± 6.2 %, 37.9 ± 7.3 %, 55.8 ± 7.2 %, 66.2 ± 7.5 % и 82.2 ± 8.1 % ($n=6$, $p<0.05$), соответственно, от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения (Рис. 1Б).

Следовательно, направленность изменения МН гладкомышечных сегментов аорты крысы зависит от концентрации сероводорода и способа индукции сокращения. В самом деле, NaHS во всем диапазоне использованных концентраций дозозависимо расслаблял сосудистые сегменты, предсокращенные ФЭ. В сосудистых сегментах, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, NaHS в малых (до 100 мкМ) концентрациях увеличивал, а в больших (500, 1000 мкМ) снижал МН сегментов аорты.

3.2. Исследование механизмов констрикторного действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса. Индуктор освобождения кальция из

саркоплазматического ретикула (СПР) кофеин (1мМ) обращал констрикторное действие 5, 10, 50, 100мкМ NaHS на релаксирующее. Величина

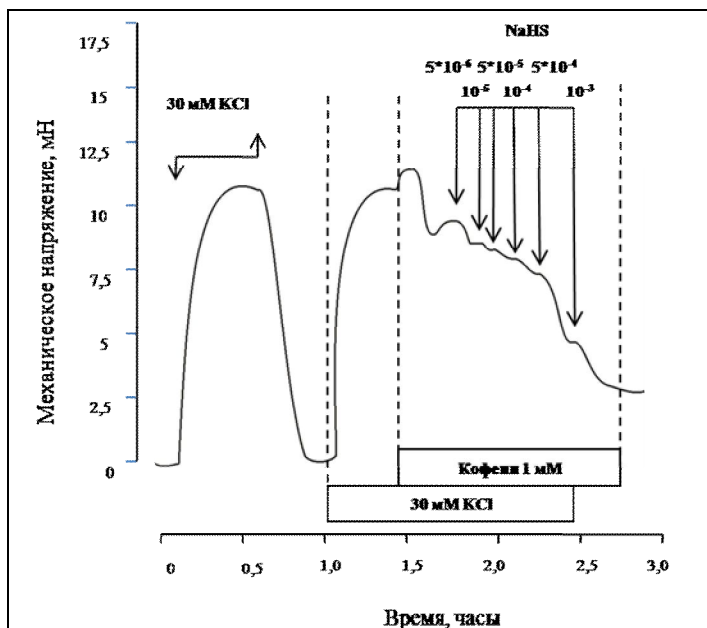


Рис. 2. Влияние NaHS на механическое напряжение сосудистого сегмента аорты крысы, предсокращенного гиперкалиевым раствором Кребса в присутствии кофеина. По оси ординат – механическое напряжение (мН). По оси абсцисс – время (часы).

(рис.2).

Таким образом, истощение кофеин-чувствительного Ca^{2+} -депо саркоплазматического ретикула СГМК устраняло констрикторное действие низких концентраций сероводорода. Соответственно, можно предположить, что малые концентрации (5-100 мкМ) NaHS индуцируют сократительные ответы сосудистых сегментов за счет освобождения ионов Ca^{2+} из СПР. Вместе с тем, Ca^{2+} является кофактором, необходимым для открывания Ca^{2+} -активируемых хлорных каналов. Активация входящего хлорного тока ведет к дополнительной деполяризации мембраны СГМК и приросту МН [Kovalev I.V., 2003; Anfinogenova Y., 2004]. Наряду с этим, в исследованиях Kim J.A. et al. (2001) и Shin J.-H. et al. (2004) было установлено, что увеличение цитоплазматической концентрации Ca^{2+} активирует Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -котранспорт (NKCC) в СГМК.

расслабления составила $3.9 \pm 1.2\%$; $5.1 \pm 1.9\%$; $11.8 \pm 4.6\%$ и $19.6 \pm 3.9\%$ ($n=6$, $p<0.05$), соответственно, от величины контрольного сокращения в гиперкалиевом растворе Кребса. Расслабляющее действие 500 мкМ NaHS статистически значимо не изменялось, тогда как действие 1000 мкМ NaHS усиливалось: величина расслабления составила $73.8 \pm 6.0\%$ ($n=6$, $p<0.05$) от величины контрольного сокращения сегментов аорты в гиперкалиевом растворе Кребса

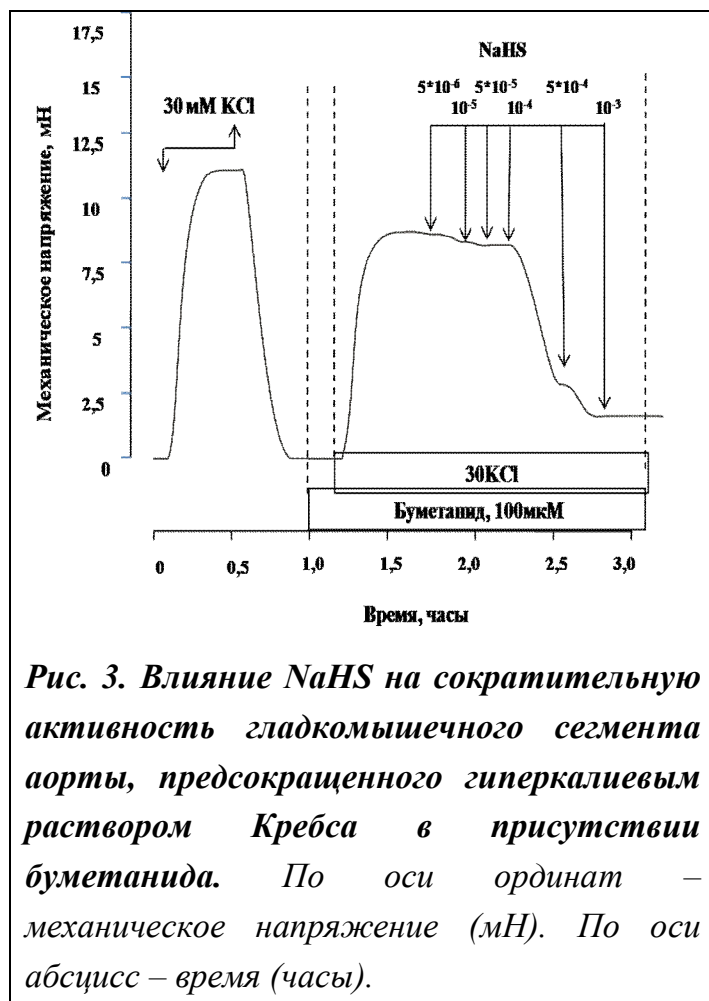


Рис. 3. Влияние NaHS на сократительную активность гладкомышечного сегмента аорты, предсокращенного гиперкалиевым раствором Кребса в присутствии буметанида. По оси ординат — механическое напряжение (мН). По оси абсцисс — время (часы).

Для исследования роли НКСС в механизмах действия сероводорода на сократительную активность сегментов аорты крысы использовали ингибитор НКСС буметанид. Предобработка в течение 15 мин сосудистых гладких мышц буметанидом (100 мкМ) устраняла констрикторное действие 5, 10, 50, 100 мкМ NaHS. Напротив, в этих случаях МН сосудистых сегментов уменьшалось на 4.1 ± 1.2 % ($n=5$, $p>0.5$); 7.9 ± 1.9 % ($n=7$, $p<0.05$); 6.4 ± 2.8 % ($n=5$, $p<0.05$), 66.2 ± 5.8 % ($n=6$; $p<0.05$), соответственно, от

величины контрольного сокращения сосудистых сегментов в гиперкалиевом растворе Кребса. NaHS в концентрации 500 мкМ расслаблял сосудистые сегменты на 81.0 ± 4.0 % ($n=5$, $p<0.05$) от контрольного сокращения в гиперкалиевом растворе Кребса. Добавление 1000 мкМ NaHS дополнительного изменения МН не вызывало (Рис. 3).

Для верификации роли НКСС в механизмах констрикторного действия сероводорода исследовали изменение его активности при действии NaHS. Активность НКСС была изучена как буметанид-чувствительный компонент входа $^{86}\text{Rb}^+$ в СГМК. Результаты исследований приведены в табл. 1.

Полученные данные свидетельствуют об активации Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспортера низкими концентрациями сероводорода. Следовательно, можно полагать, что НКСС является одной из ключевых мишеней, через которую реализуется сократительное действие сероводорода на сосудистые гладкие мышцы.

Таблица 1

**Влияние гидросульфида натрия на активность Na^+ , K^+ , 2Cl^- -
котранспорта**

| Концентрация гидросульфида натрия, мкМ | Активность Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспорта, % |
|--|--|
| NaSH, 0 (контроль) | 100.0 |
| 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 отсутствии NaHS принята за 100%.

* - $p < 0.05$ в сравнении с контролем.

3.3. Исследование роли калиевой проводимости мембраны в механизмах действия сероводорода на сократительную активность сосудистых гладких мышц, индуцированную гиперкалиевым раствором Кребса. Многочисленные исследования указывают на калиевые каналы мембраны СГМК как основную мишень H_2S , через воздействие на которую реализуется вазорелаксирующее действие этого газотрансмиттера. Для выявления вклада отдельных компонентов калиевой проводимости мембраны в реализацию эффектов H_2S использовались соответствующие блокаторы калиевых каналов.

Тестировалось действие NaHS в концентрации 500 мкМ, близкой к EC_{50} для расслабляющего сосудистые ГМ действия H_2S , которое составило $35.1 \pm 7.5\%$ ($n=6$, $p < 0.05$) от амплитуды контрольного сокращения, вызванного гиперкалиевым раствором Кребса.

Блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний (ТЭА) в концентрации 10 мМ достоверно снижал расслабляющее действие 500 мкМ NaHS, которое составило $13.9 \pm 3.2\%$ ($n=6$; $p < 0,05$) от контрольного сокращения на действие гиперкалиевого раствора Кребса (Рис. 4А). Поскольку ТЭА в миллимолярных

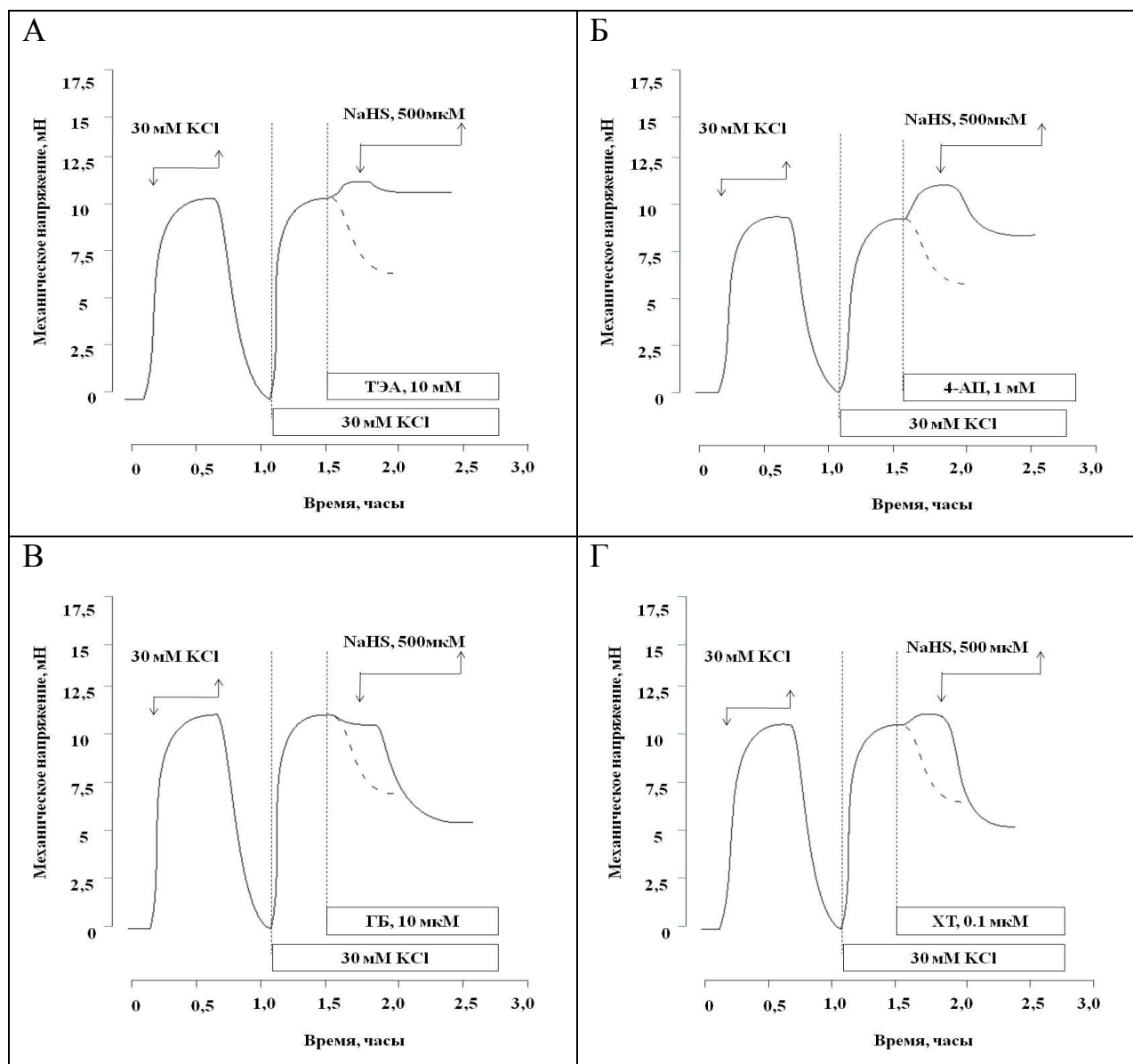


Рис. 4. Влияние тетраэтиламмония (А), 4-аминопиридина (Б), глибенкламида (В) и харибдотоксина (Г) на эффекты NaHS (500 мкМ) в гладкомышечных сегментах аорты крысы, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса. По оси ординат – механическое напряжение (мН). По оси абсцисс – время (часы). Пунктирная линия – расслабление сегмента при действии NaHS (500 мкМ) в отсутствие блокатора калиевых каналов.

концентрациях примерно в равной степени блокирует Ca^{2+} -активируемые K^+ каналы большой (BK_{Ca}), промежуточной (IK_{Ca}) и малой (SK_{Ca}) проводимости, а также потенциал-зависимые K^+ -каналы мембраны СГМК [Sheng J.Z., Braun A.P., 2007], для выявления вклада каждого из этих компонентов калиевой проводимости мембраны использовали селективные блокаторы калиевых каналов.

Блокатор потенциал-зависимых калиевых каналов 4-аминопиридин (4-АП) в концентрации 1 мМ не влиял на величину релаксации СГМ, вызванную NaHS (500 мкМ) (Рис. 4Б). Можно полагать, что угнетение ТЭА релаксирующего действия H_2S обусловлено блокированием Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов. Блокатор $ВК_{Ca}$ – каналов харибдотоксин (ХТ) в концентрации 0.1 мкМ усиливал релаксирующее действие 500 мкМ NaHS, которое составило 56.4 ± 9.6 % ($n=3$, $p<0.05$) (Рис. 4Г). Следовательно, ТЭА уменьшает H_2S – индуцированную релаксацию сосудистых сегментов через блокирование IK_{Ca} - и SK_{Ca} -каналов. Блокатор АТФ-чувствительных K^+ -каналов глибенкламид (ГБ) в концентрации 10 мкМ также усиливал расслабляющее действие NaHS, которое составило 54.3 ± 6.6 % ($n=6$, $p<0.05$) от величины контрольного сокращения в гиперкалиевом растворе Кребса (Рис. 4В).

Относительный вклад исследуемых типов калиевых каналов в механизмы расслабления сероводородом сосудистых сегментов, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, представлен в табл.2.

Таблица 2

Относительный вклад калиевых каналов в механизмы релаксирующего действия сероводорода на сокращения сосудистых сегментов, вызванные гиперкалиевым раствором Кребса

| Блокатор | Относительная величина расслабления |
|--------------|-------------------------------------|
| ТЭА (10мМ) | 0.09 |
| 4-АП (1мМ) | 0.19 |
| ГБ (10мкМ) | 0.35 |
| ХТ (0,1 мкМ) | 0.37 |

ТЭА - тетраэтиламмоний, ГБ - глибенкламид, 4-АП - 4-аминопиридин, ХТ – харибдотоксин.

3.4. Исследование роли калиевой проводимости мембраны в механизмах действия сероводорода на сократительную активность сосудистых гладких мышц, индуцированную фенилэфрином. Расслабляющее

действие, близкое к EC_{50} , NaHS оказывал в концентрации 100 мкМ. Величина расслабления при этом составила 55.8 ± 7.2 % ($n=6$, $p<0.05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения.

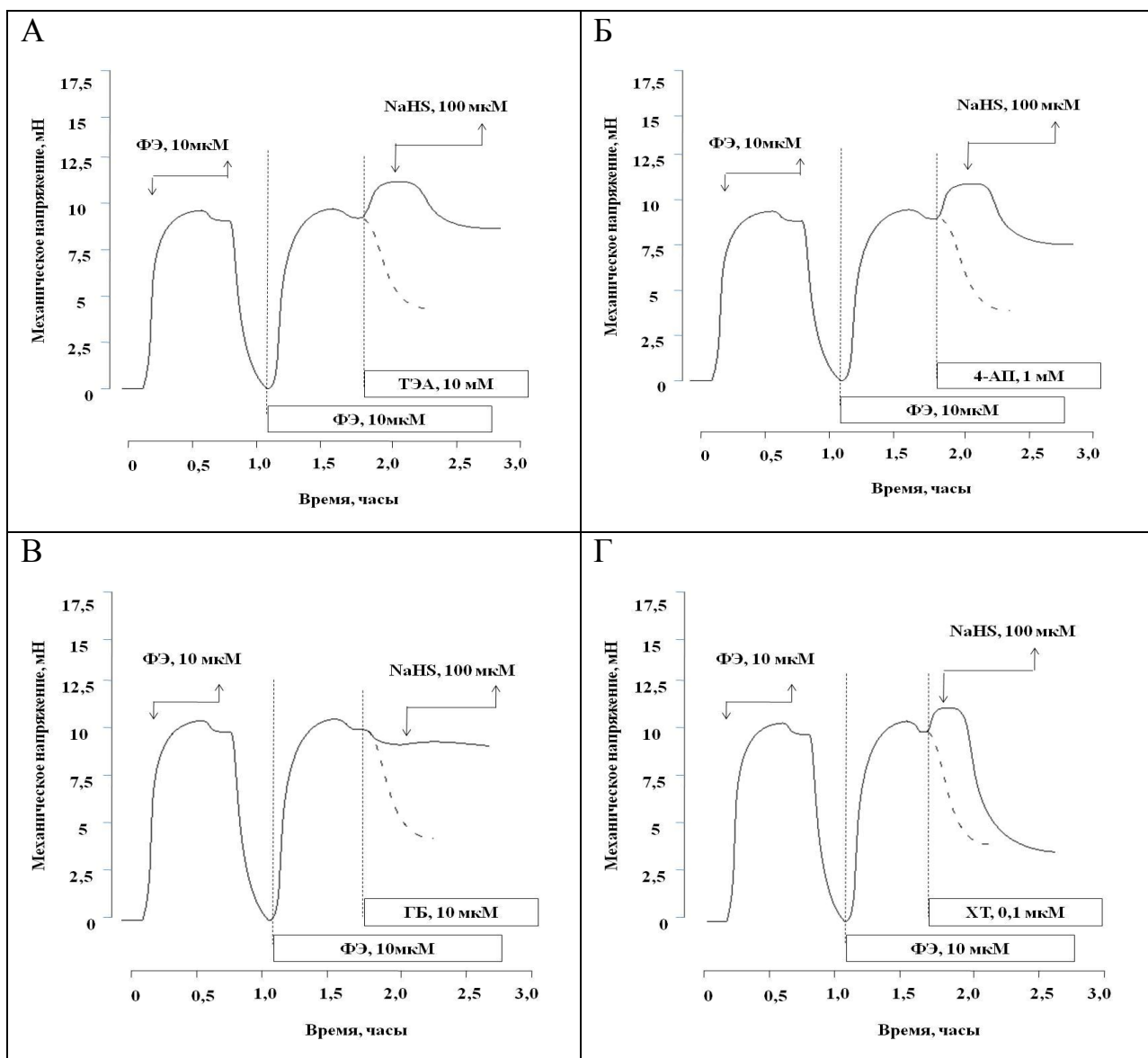


Рис. 5. Влияние тетраэтиламмония (А), 4-аминопиридина (Б), глибенкламида (В) и харибдотоксина (Г) на эффекты гидросульфида натрия (100 мкМ) в гладкомышечных сегментах аорты крысы, предсокращенных фенилэфрином. По оси ординат – механическое напряжение (мН). По оси абсцисс – время (часы). Пунктирная линия – расслабление сегмента при действии NaHS (500 мкМ) в отсутствии блокатора калиевых каналов.

ТЭА (10 мМ) достоверно снижал релаксирующее действие 100 мкМ NaHS: его величина составила 13.8 ± 5.2 % ($n=9$, $p<0,05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения (Рис. 5А). В присутствии 4-АП (1 мМ)

релаксирующее действие 100 мкМ NaHS достоверно снижалось: его величина составила 16.2 ± 2.7 % ($n=7$, $p<0,05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения (Рис. 5Б). В то же время, ГБ (10 мкМ) полностью устранял релаксирующее действие 100 мкМ NaHS (Рис. 5В). ХТ (0.1 мкМ) статистически значимого влияния на величину H₂S-индуцированной релаксации не оказывал (Рис. 5Г).

Относительный вклад исследуемых типов калиевых каналов в механизмы расслабления сероводородом сосудистых сегментов, предсокращенных ФЭ, представлен в табл. 3.

Таблица 3

Относительный вклад калиевых каналов в механизмы релаксирующего действия сероводорода на сокращения сосудистых сегментов, вызванные фенилэфрином

| Блокатор | Относительная величина расслабления |
|--------------|-------------------------------------|
| ТЭА (10мМ) | 0.19 |
| 4-АП (1мМ) | 0.23 |
| ГБ (10мкМ) | 0.01 |
| ХТ (0,1 мкМ) | 0.57 |

ТЭА - тетраэтиламмоний, ГБ - глибенкламид, 4-АП - 4-аминопиридин, ХТ – харибдотоксин.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что главенствующую роль в механизмах расслабления сероводородом СГМК аорты крысы играет открывание АТФ-чувствительных калиевых каналов.

Заключение

Одним из основных физиологических эффектов сероводорода является вазорелаксация. В наших исследованиях было установлено разнонаправленное действие сероводорода на МН сосудистых сегментов, которое зависело от концентрации газотрансмиттера и природы предсокращения. Документировано, что при сокращении, вызванном действием ФЭ, H₂S оказывал только

дозозависимое релаксирующее действие на СГМ, а в условиях предсокращения сосудистых сегментов гиперкалиевым раствором Кребса низкие концентрации NaHS (1-100 мкМ) оказывали констрикторное действие на СГМК, которое обращалось на релаксирующее при действии более высоких концентраций донора сероводорода. Выявленные различия влияния сероводорода на МН сосудистых сегментов, по-видимому, связаны с различной природой этих сокращений. В самом деле, увеличение МН ГМК, вызванное деполяризацией мембраны гиперкалиевым раствором Кребса, обусловлено оперированием только кальций-кальмодулиновой (Ca-КМ) ветви кальциевой сигнальной системы. Тогда как в индукцию и поддержание сокращения, вызванного ФЭ, вовлечены обе ее ветви: Ca-КМ и С-киназная.

В литературе отсутствуют данные о роли НКСС в механизмах действия сероводорода. Однако результаты наших исследований свидетельствуют о том, что данный котранспортер является основным эффектором констрикторного влияния сероводорода. В самом деле, ингибитор НКСС буметанид устранял констрикторное действие сероводорода на СГМК, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса. В радиоизотопных исследованиях получены прямые доказательства активации сероводородом буметанид-чувствительного компонента транспорта $^{86}\text{Rb}^+$ в изолированные СГМК аорты крысы, который является маркером активности НКСС. Цепь молекулярных событий, опосредующих сократительную реакцию СГМК при действии H_2S , может заключаться в следующем: активация сероводородом НКСС увеличивает электрохимический потенциал Cl^- , усиливает входящий хлорный ток, обуславливающий деполяризацию мембраны, открывание дополнительного числа потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа и увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [Kovalev I.V. et al., 2003; Anfinogenova Y. et al., 2004]. Как показали наши исследования, определенную роль в этом процессе играет освобождение сероводородом из саркоплазматического ретикулума СГМК ионов Ca^{2+} , которые являются кофактором открывания Ca^{2+} -активируемых Cl^- -каналов.

Согласно полученным нами данным, расслабление СГМК аорты крысы при действии сероводорода связано с увеличением калиевой проводимости мембраны указанных клеток. Для расслабления сероводородом СГМК, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, ключевую роль играет открывание кальций-активируемых калиевых каналов, тогда как для СГМК, предсокращенных ФЭ, - АТФ-чувствительных калиевых каналов плазмалеммы.

В самом деле, известно, что ТЭА в миллимолярных концентрациях примерно в равной степени блокирует $ВК_{Ca}$, IK_{Ca} [Davis J.P.L. et al., 1993; Jiang G. et al., 2003] и SK_{Ca} [Sheng J.-Z., 2007], а также потенциал-зависимые K^+ каналы [Ikeda S.R., 1995]. Наши эксперименты с избирательным блокированием харибдотоксином $ВК_{Ca}$ -каналов не выявили участия этих каналов в механизмах релаксации сероводородом СГМК. Селективное блокирование потенциал-зависимых K^+ -каналов 4-АП также практически не влияло на индуцированную H_2S релаксацию сегментов аорты крысы. В соответствии с этим, полученные нами данные свидетельствует в пользу заключения о том, что открывание Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов малой и промежуточной проводимости является ключевым механизмом реализации расслабляющего действия сероводорода на ГМК аорты крысы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса.

Выводы

1. Сероводород оказывает разнонаправленное действие на сокращения сосудистых гладкомышечных клеток, индуцированные деполяризацией мембраны: констрикторное - в малых, и релаксирующее - при действии высоких концентраций.
2. Сероводород дозозависимо расслабляет гладкие мышцы аорты, предсокращенные стимуляцией фенилэфрином α_1 -адренорецепторов.
3. Ключевую роль в реализации констрикторного действия низких концентраций сероводорода на сосудистые сегменты, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса, играет активация Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ - котранспорта.
4. Релаксирующее действие сероводорода на предсокращенные в

гиперкалиевом растворе Кребса сосудистые гладкие мышцы обусловлено открыванием кальций-активируемых калиевых каналов малой и промежуточной проводимости.

5. В сосудистых гладких мышцах, предсокращенных активацией α_1 -адренэргических рецепторов, релаксация, индуцированная сероводородом, связана с открыванием АТФ-чувствительных калиевых каналов мембраны.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Смаглий Л.В. Роль газовых посредников в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток аорты крысы / Л.В. Смаглий, К.В. Еременко // Материалы 74-ой итоговой студенческой научно – практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения профессора А.М. Дыхно, Красноярск. - 2010. – С.829 – 831.

2. Вторушина Т.А. Влияние сероводорода на механизмы сопряжения возбуждения-сокращения гладкомышечных клеток / Т.А. Вторушина, Л.В. Смаглий, Д.С.Носов // Науки о человеке: сборник статей по материалам XI конгресса молодых ученых и специалистов, Томск. - 2010. – С.49 – 50.

3. Смаглий Л.В. Роль сероводорода в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток аорты крысы / Л.В. Смаглий, А.С. Желудева, К.В. Еременко и др. // Науки о человеке: сборник статей по материалам XI конгресса молодых ученых и специалистов, Томск. - 2010. – С.67 – 68.

4. Баскаков М.Б. Влияние сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы / М.Б. Баскаков, С.В. Гусакова, А.С. Желудева, Л.В. Смаглий и др. // **Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – №6. – С.12-17.**

5. Смаглий Л.В. Сероводород как регулятор сократительной активности гладкомышечных клеток сосудов / Л.В. Смаглий, А.С. Желудева, К.В. Еременко и др. // Психофизиологические и висцеральные функции в норме и патологии»: материалы V международной научной конференции, посвященной 100 -летию со дня рождения профессора Павла Дмитриевича Харченко и 65-летию НИИ физиологии имени Петра Богача, Киев. - 2010. – С. 56-57.

6. Гусакова С.В. Механизмы регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток: роль активных форм кислорода / С.В. Гусакова, М.Б. Баскаков, И.В. Ковалев, А.С. Желудева, Л.В. Смаглий и др. // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2011. – №3. – С.33-39.
7. Smagly L. Hydrogen sulfide influence on smooth muscle cells contractile properties [Электронный ресурс] / L. Smagly, A. Zheludeva, S. Gusakova et al. // Journal of hypertension. – 2011. - V.29. – P. e335. – Режим доступа: http://journals.lww.com/jhypertension/Citation/2011/06001/Effect_of_Hydrogen_Sulfide_on_Mechanisms_Coupling.965.aspx.
8. Baskakov M. Mechanisms of action of hydrogen sulfide on contractile activity vascular smooth muscle [Электронный ресурс] / M. Baskakov, S. Gusakova, A. Zheludeva, L. Smagly et al. // Journal of hypertension. – 2011. - V.29. – P. e335. – Режим доступа: http://journals.lww.com/jhypertension/Citation/2011/06001/Mechanisms_of_Action_of_Hydrogen_Sulfide_on.966.aspx.
9. Kovalev I. Effect of hydrogen sulfide on mechanisms coupling excitation of smooth muscle cells guinea pig ureter [Электронный ресурс] / I. Kovalev, S. Gusakova, M. Baskakov, A. Popov, O. Melnik, T. Vtorushina, D. Nosov, A. Zheludeva, L. Smagly et al. // Journal of hypertension. – 2011. - V.29. – P. 334. – Режим доступа: http://journals.lww.com/jhypertension/Citation/2011/06001/Hydrogen_Sulfide_Influence_on_Vascular_Smooth.967.aspx.
10. Smagly L. Hydrogen sulfide influence on vascular smooth muscle cells mechanical tension: role of intracellular calcium [Электронный ресурс] / L. Smagly, A. Zheludeva, S. Gusakova et al. // Journal of hypertension. – 2012. - V.30. – P. e367. – Режим доступа: http://journals.lww.com/jhypertension/Documents/ESH_2012.pdf.
11. Смаглий Л.В. Роль $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ – котранспорта в механизмах вазоконстрикторного действия сероводорода [Электронный ресурс] / Л.В.

Смаглий // **Современные проблемы науки и образования.** – 2013. – № 2. -
Режим доступа: <http://www.science-education.ru/108-8675>.

12. Баскаков М.Б. Ионные механизмы действия газотрансмиттеров на сократительную активность сосудистых гладких мышц / М.Б. Баскаков, С.В. Гусакова, А.С. Желудева, Л.В. Смаглий и др. // **Известия высших учебных заведений.** – 2013. – 4/2. – С.73-78.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

СГМ – сосудистые гладкие мышцы

4-АП – 4-аминопиридин

ГБ – глибенкламид

ГМК – гладкомышечные клетки

K^+ _{АТФ}-каналы – АТФ – чувствительные калиевые каналы

K^+ _{Ca²⁺}-каналы – кальций – активируемые калиевые каналы

МН – механическое напряжение

СГМ – сосудистые гладкие мышцы

СГМК – сосудистые гладкомышечные клетки

СПР – саркоплазматический ретикулум

ТЭА – тетраэтиламмония хлорид

ФЭ – фенилэфрин

ХТ – харибдотоксин

цАМФ – циклический 3:5-аденозинмонофосфат

IK_{Ca} – кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости

H_2S – сероводород

IK_{Ca} - кальций-активируемые калиевые каналы промежуточной проводимости

K^+ _v – каналы – потенциал-зависимые калиевые каналы

NaHS – гидросульфид натрия

SK_{Ca} - кальций-активируемые калиевые каналы малой проводимости

Подписано в печать 21.05.2013

Усл. печ. листов 1,25 Печать на ризографе.

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

634050, г. Томск, ул. Московский тракт 2, тел 53-04-08

Заказ № 121

Тираж 100 экземпляров