

РОЛЬ К(АТФ)–КАНАЛОВ В ЭФФЕКТАХ СЕРОВОДОРОДА НА СОКРАТИМОСТЬ МИОКАРДА ЖЕЛУДОЧКА КРЫСЫ

Н.Н. Хаертдинов, А.С. Лифанова, А.Р. Гиззатуллин, Г.Ф. Ситдикова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Role of K(ATP)–channels in the effects of hydrogen sulfide on the contractility of rat ventricular myocardium

N.N. Khaertdinov, A.S. Lifanova, A.R. Gizzatullin, G.F. Sitdikova

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

Исследовали влияние гидросульфида натрия (NaHS) - донора сероводорода (H_2S) на силу сокращения изолированных полосок миокарда правого желудочка крысы. При аппликации в концентрациях 1 и 10 мкМ NaHS оказывал положительный инотропный эффект, тогда как 50, 100, 200, 300 мкМ NaHS вызывали дозозависимое уменьшение амплитуды сокращений. Ингибирование К-каналов тетраэтиламмонием (15 мМ) приводило к усилению амплитуды сокращения миокарда, отрицательный инотропный эффект NaHS (200 мкМ) при этом сохранялся. В условиях активации или ингибирования АТФ-зависимых К-каналов диазоксидом (20 мкМ) или глибенкламидом (50 мкМ), соответственно, отрицательный инотропный эффект NaHS полностью сохранялся. В условиях предварительной аппликации донора H_2S глибенкламид (20 мкМ) возвращал силу сокращения к контрольным значениям. Полученные данные свидетельствуют, что в миокарде правого желудочка крысы экзогенный H_2S вызывает уменьшение силы сокращений, которое опосредуется активацией АТФ-зависимых К-каналов.

Ключевые слова: сероводород, миокард правого желудочка крысы, сократимость миокарда, калиевые каналы, АТФ-зависимые калиевые каналы.

The effect of sodium hydrosulfide (NaHS) - donor of hydrogen sulfide (H_2S) on the force of contraction of isolated rat ventricle was studied. Application of NaHS in concentrations 1 and 10 μM resulted in an increase and in concentrations 50, 100, 200 and 300 μM - dose-dependent decrease of the force of contraction. Inhibition of K-channels by tetraethylammonium (15 mM) caused the increase of the amplitude of contraction and the negative inotropic effect of NaHS (200 μM) was preserved. After the activation or inhibition of ATP-dependent K-channels by diazoxide (20 μM) or glibenclamide (50 μM), respectively, the negative inotropic effect of NaHS was the same as in control. After preliminary application of NaHS glibenclamide (50 μM) reversed the contraction force to the control values. The obtained data suppose that in the isolated rat ventricle exogenous H_2S causes a reduction of the force of contraction, which is mediated by the activation of ATP-dependent K-channels.

Keywords: hydrogen sulfide, right ventricular rat, myocardial contractility, potassium channel, ATP-dependent potassium channel.

Введение

Сероводород (H_2S) является сигнальной молекулой, участвующей в регуляции некоторых функций сердечно-сосудистой [1, 2], нервной [2–4], репродуктивной систем [2], а также желудочно-кишечного тракта [2, 5]. Цистатионин γ -лиаза (ЦГЛ) – основной H_2S -продуцирующий фермент в сердечно-сосудистой системе, где он обнаруживается в гладкой мускулатуре, эндотелии и кардиомиоцитах [2, 6, 7]. Помимо этого 3-меркаптосульфотрансфераза (3-МСТ) при участии цистеин аминотрансферазы (ЦАТ) синтезирует H_2S в эндотелиальных клетках сосудов [8]. В сердечно-сосудистой системе H_2S принимает участие в регуляции тонуса сосудов и обнаружен у всех исследованных к настоящему времени позвоночных – рыб, амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих и, по-видимому, является более древней сигнальной молекулой, чем NO [9]. Показано также, что H_2S уменьшает сократительную активность сердечной мышцы у различных животных и замедляет частоту сердечных сокращений *in vitro* и *in vivo* [10–12]. В ряде исследований выявлено кардиопротекторное действие H_2S при различных патологических состояниях. Так, при гипоксии предварительное введение донора H_2S , гидросульфида натрия (NaHS) увеличивает жизнеспособность кардиомиоцитов, а ингибитор ЦГЛ пропаргилглицин, оказывает противоположный эффект [13]. Эндогенный H_2S вызывает кардиопротективный эффект у крыс с модельным инфарктом миокарда [14].

Целью настоящей работы было исследование эффектов экзогенного H_2S на сократимость миокарда крысы, а также выявление роли К-каналов различных типов в эффектах H_2S .

Материал и методы

Сократительную активность миокарда исследовали на изолированных препаратах правого желудочка сердца крысы с использованием 4-канальной установки Biopac Systems, Inc. (США), оснащенной изометрическим датчиком силы TSD 125С с диапазоном измерений 0–50 грамм. Исследование выполняли в соответствии с международными требованиями по работе с животными, утвержденными локальным этическим комитетом (КФУ, приказ №0.1.1.67-06/101/14 от 12.06.2014). Животное анестезировали 5% изофлураном (Abbott Laboratories, США). После препаровки из ткани правого желудочка вырезались полоски длиной 4–6 мм и диаметром 0,8–1,0 мм. Препарат помещали вертикально в резервуар объемом 20 мл с рабочим раствором Кребса в мМ: NaCl – 137,0; KCl – 5,0; $MgSO_4$ – 1,0; $NaHCO_3$ – 11,0; $CaCl_2$ – 2,2; глюкоза – 11,0; аскорбиновая кислота – 0,3. Для поддержания pH в пределах 7,2–7,4 в раствор добавляли основной буфер NaH_2PO_4 – 1,0 мМ (все препараты фирмы Sigma, США). В течение всего эксперимента раствор в резервуаре обогащался карбогеном (97% O_2 и 3% CO_2). Препарат стимулировался электрическим сигналом через 2 электрода с помощью стимулятора ЭСП-2 (Россия)

с частотой стимулов 0,1 Гц, амплитудой сигнала 40 мВ, продолжительность стимула 5 мс. После погружения препарата в резервуар следовал период приработки в течение 40-60 мин., по окончании которого регистрировались исходные параметры напряжения полоски миокарда. Запись кривой напряжения регистрировали на персональном компьютере при помощи программного обеспечения Elf (автор А.В. Захаров). Оценивали сократительную активность миокарда желудочков по силе напряжения. Статистический анализ проводили помощью стандартных методов, достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

В качестве донора H_2S использовали NaHS [3], так как в водных растворах диссоциирует до иона натрия (Na^+) и гидросульфидного аниона (HS^-), который реагирует с протоном (H^+), образуя H_2S . Показано, что эффективная концентрация H_2S в растворе зависит от pH, температуры, солевого состава, улутучивания газа в течение эксперимента, и в наших условиях составляет только 11–13% от исходной концентрации NaHS [3, 15].

Результаты и обсуждение

Апликация донора H_2S – NaHS в низких концентрациях (1, 10 мкМ) приводила к достоверному увеличению силы напряжения полоски миокарда на $10,82 \pm 2,54\%$ ($n = 10$; $p < 0,001$) и $8,58 \pm 1,87\%$ ($n = 8$; $p < 0,001$), соответственно (рис. 1).

Добавление NaHS в более высоких концентрациях 50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ и 300 мкМ дозо-зависимо снижало силу напряжения относительно контрольного уровня на $16,28 \pm 4,23\%$ ($n = 8$; $p < 0,001$), $57,42 \pm 5,43\%$ ($n = 8$; $p < 0,001$), $59,11 \pm 6,39\%$ ($n = 16$; $p < 0,001$) и $61,44 \pm 7,31\%$ ($n = 10$; $p < 0,001$) соответственно (рис. 1). Отрицательный инотропный эффект NaHS наблюдался с первых минут и выходил на плато к 15 мин. апликации. Таким образом, экзогенный H_2S в зависимости от концентрации может оказывать как положительное, так и отрицательное инотропное действие. Подобное действие наблюдалось в гладкомышечных клетках сосудов, где низкие дозы H_2S вызывали вазоконстрик-

цию, что, по-видимому, опосредуется изменением уровня эндотелиального NO. Так, при смешивании NaHS и NO показано угнетение сосудорасширяющих эффектов последнего *in vitro* и *in vivo* [16]. Угнетение силы напряжения полосок желудочкового миокарда крысы было также показано в исследованиях на миокарде холоднокровных животных [11, 12].

В дальнейших экспериментах использовали дозу H_2S в концентрации 200 мкМ.

Ионные каналы являются одной из основных мишеней действия H_2S в различных тканях [4, 11, 15, 17]. Известно, что целый ряд K-токов участвует в реполяризации мембраны кардиомиоцитов в различные фазы потенциала действия [18]. Для блокирования K-каналов использовали неселективный ингибитор тетраэтиламмоний хлористый (ТЭА), который наиболее эффективно увеличивал силу напряжения полоски миокарда в концентрации 15 мМ, при которой сила напряжения увеличилась на $32,14 \pm 6,68\%$ ($n = 10$; $p < 0,001$) от контрольного уровня (рис. 2А). На фоне действия ТЭА эффект NaHS полностью сохранился и не отличался от эффекта NaHS в контроле (рис. 2А).

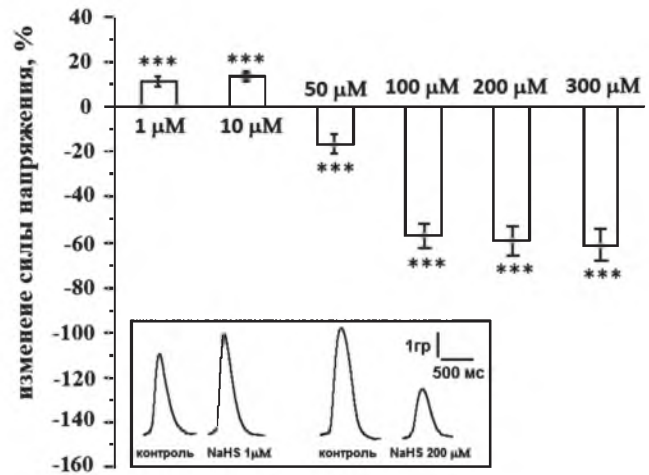


Рис. 1. Влияние NaHS на силу сокращения миокарда желудочка крысы. *** – $p < 0,001$

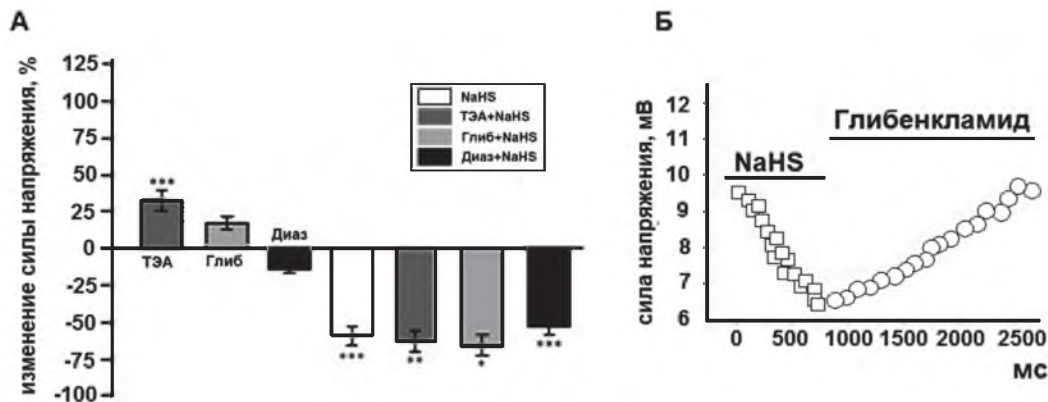


Рис. 2. Роль калиевых каналов в эффектах сероводорода на сократимость миокарда желудочка:

А – эффекты NaHS (200 мкМ) в контроле, на фоне неселективного блокирования калиевых каналов тетраэтиламмонием (ТЭА, 15 мМ), ингибирования или активация K(ATФ)-каналов глибенкламидом (Глиб, 50 мкМ) или диазоксидом (Диаз, 20 мкМ) в % по отношению к контрольным значениям; *** – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,05$; Б – Пример эксперимента, в котором блокатор K(ATФ)-каналов глибенкламид 50 мкМ восстанавливает силу напряжения полоски миокарда после предварительной апликации NaHS

Одним из известных механизмов действия H_2S в гладких мышцах сосудов и кардиомиоцитах крысы является активация $K(ATФ)$ -каналов [6]. Для активации $K(ATФ)$ -каналов использовали диазоксид, который в концентрации 20 мкМ приводил к небольшому недостоверному снижению силы напряжения полоски миокарда на $10,46 \pm 3,25\%$ ($n = 5$; $p > 0,05$). На фоне активации $K(ATФ)$ -каналов NaHS уменьшал силу напряжения на $53,08 \pm 5,92\%$ ($n = 14$; $p < 0,001$), что не отличалось от эффекта NaHS в контроле (рис. 2А). Ингибирование $K(ATФ)$ -каналов селективным блокатором глибенкламидом в концентрации 50 мкМ приводило к достоверному увеличению силы напряжения желудочкового миокарда на $21,29 \pm 4,21\%$ ($n = 6$; $p < 0,05$) относительно базовых показателей. На фоне блокирования $K(ATФ)$ -каналов отрицательный инотропный эффект NaHS сохранялся, и сила напряжения уменьшилась на $66,27 \pm 7,31\%$ ($n = 5$; $p < 0,05$) относительно исходных значений (рис. 2А). Однако, глибенкламид восстанавливал сократимость миокарда при аппликации на фоне действия NaHS (рис. 2Б).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Лифанова А.С., Хаертдинов Н.Н., Захаров А.В. и др. Роль калиевых каналов в отрицательном инотропном эффекте сероводорода в предсердии мыши. *Гены и Клетки* 2014; IX(3): 94-8.
2. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol. Rev.* 2012; 92: 791-896.
3. Abe K., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* 1996; 16: 1066-71.
4. Gerasimova E., Lebedeva J., Yakovlev A. et al. Mechanisms of hydrogen sulfide (H_2S) action on synaptic transmission at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 2015; 303: 577-85.
5. Distrutti E., Sediari L., Mencarelli A. et al. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 316: 325-35.
6. Zhao W., Zhang J., Lu Y. et al. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J.* 2001; 20(6): 8-16.
7. Chasse J.F., Paul V., Escanez R. et al. Human cystathionine β -synthase: gene organization and expression of different 5' alternative splicing. *Mammalian Genome* 1997; 8: 917-21.
8. Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* 2004; 26: 243-54.
9. Dombkowski R.A., Russell M.J., Schulman A.A. et al. Vertebrate phylogeny of hydrogen sulfide vasoactivity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005; 288: 243-52.
10. Liu Y. H., Lu M., Hu L. F. et al. Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system. *Antioxidants & Redox Signaling* 2012; 17(1): 141-85.
11. Ситдикова Г.Ф., Хаертдинов Н.Н., Зефилов А.Л. Исследование роли кальциевых и калиевых каналов в эффектах сероводорода на сократимость миокарда лягушки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2011; 151(2): 124-8.

Известно, что роль $K(ATФ)$ -каналов в физиологических условиях незначительна, и их активация происходит при нарушении нормального функционирования сердечно-сосудистой системы, как механизм защиты от повреждения [19] при ишемии, гипоксии, гипогликемии [20]. По-видимому, аппликация NaHS вызывает активацию $K(ATФ)$ -каналов, что ведет к гиперполяризации мембраны, снижению входящего Ca^{2+} -тока и уменьшению силы сокращения. Активация $K(ATФ)$ -каналов наблюдалась при действии NaHS и в других возбудимых клетках, таких как GH3 клетки гипофиза крысы и инсулин секретирующих клеток INS-1E, что приводило к уменьшению секреции гормона роста и пролактина или инсулина [21, 22]. В данных исследованиях глибенкламид, апплицируемый после NaHS, возвращал $K(ATФ)$ -токи к уровню контроля.

Полученные нами данные свидетельствуют, что экзогенный H_2S в зависимости от концентрации может оказывать как положительное (в низких концентрациях), так и отрицательное (в более высоких концентрациях) инотропное действие. Одной из клеточных мишеней H_2S в реализации отрицательного инотропного эффекта являются $K(ATФ)$ -каналы.

12. Khaertdinov N.N., Ahmetshina D.R., Zefirov A.L. et al. Hydrogen sulfide in regulation of frog myocardium contractility. *Biochemistry (Moscow) Supplement series A: Membrane and Cell Biology* 2013; 7(1): 52-7.
13. Zhu Y.Z., Wang Z.J., Ho P. et al. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *J. Appl. Physiol.* 2007; 102: 261-8.
14. Вараксин А.А., Пуцина Е.В. Значение сероводорода в регуляции функций органов. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2012; 2: 27-34.
15. Sitdikova G.F., Fuchs R., Kainz V. et al. Phosphorylation of BK channels modulates the sensitivity to hydrogen sulfide (H_2S). *Front. Physiol.* 2014; 5: 431.
16. Ali M.Y., Ping C.Y., Mok Y.Y. et al. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br. J. Pharmacol.* 2006; 149(6): 25-34.
17. Sitdikova G.F., Weiger T.M., Hermann A. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* 2010; 459: 389-97.
18. Nerbonne J.M., Kass R.S. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol. Rev.* 2005; 85: 1205-53.
19. Zhong G.Z., Li Y., Liu B. et al. Hydrogen sulfide opens the KATP channel on rat atrial and ventricular myocytes. *Cardiology* 2010; 115: 120-6.
20. Babenko A.P., Aguilar-Bryan L., Bryan J. A view of sur KIR6.X, KATP channels. *Annu Rev Physiol.* 1998; 60: 667-87.
21. Mustafina A.N., Yakovlev A.V., Gaifullina A.S. et al. Hydrogen sulfide induces hyperpolarization and decreases the exocytosis of secretory granules of rat GH3 pituitary tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 465(4): 825-31.
22. Yang W., Yang G., Jia X. et al. Activation of KATP channels by H_2S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J. Physiol.* 2005; 569: 519-31.

Поступила: 12.09.2015