

цАМФ связывающие белки Ераc1,2 опосредуют сокращение сосудов под действием вазоконстрикторов и поддержание тонуса сосудов, через повышение уровня ионов кальция в цитоплазме ГМК. Важно отметить, что для подтверждения нашей гипотезы следует применить альтернативный ингибиторному анализу подход.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-32318.

ЛИТЕРАТУРА

1. Суханова И.Ф., Кожевникова Л.М., Подмарёва О.Н. и др. // ДАН. 2006. Т. 411. С. 699-703.
2. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф. и др. // Известия РАН. Серия биологическая. 2011. Т. 1. С. 68-76.
3. Norum J.H., Dawood H., Mattingly R.R. et al. // FEBS Lett. 2007. V. 581. № 1. P. 15-20.
4. Rehmann H. // Sci. Rep. 2013. V. 3: 3032.

КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ КАК МИШЕНЬ ИНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ СЕРОВОДОРОДА В ЖЕЛУДОЧКОВОМ МИОКАРДЕ КРЫСЫ

Хаертдинов Н.Н., Гаязова Э.И., Лифанова А.С., Ситдикова Г.Ф.

Казанский федеральный университет, Казань, РФ

Сероводород (H_2S) давно известен как токсичный газ [1], но все больше данных свидетельствует о том, что H_2S , наряду с другими газообразными посредниками оксидом азота (NO) и монооксидом углерода (CO), может синтезироваться эндогенно и оказывать различные физиологические и патофизиологические эффекты в сердечно-сосудистой и нервной системах, а также в желудочно-кишечном тракте [2-7]. Субстратом синтеза эндогенного H_2S в живых организмах является серосодержащая аминокислота L-цистеин. Как показали многочисленные исследования, одной из систем, где H_2S играет ключевую роль как сигнальная молекула, является сердечно-сосудистая система, в частности – кровеносные сосуды [1], осуществляя свое регуляторное действие в сосудах артериального русла, он принимает активное участие в регуляции артериального давления. Известно также что H_2S синтезируется в гладкомышечных клетках сосудов и обладает вазорелаксирующими свойствами у всех исследованных к настоящему времени позвоночных – рыб, амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих и, видимо, является более древним газомедиатором, чем NO [8,9].

Основным ферментом, продуцирующим H_2S в сердечно-сосудистой системе, является цистатионин-γ-лиаза (CBS) и

3-меркаптосульфотрансфераза (3-MST). При помощи иммуногистохимии и ПЦР с обратной транскрипцией было показано, что CBS экспрессируется в гладкомышечных клетках сосудов и не обнаружена в эндотелиальных клетках [10], однако в эндотелии сосудов отмечена активность 3-MST [11]. Показано что H_2S уменьшает сократительную способность сердечной мышцы у различных животных и замедляет частоту сердечных сокращений *in vitro* и *in vivo*. Этот эффект снижается, но полностью не устраняется ингибитором K(ATФ)-каналов глибенкламидом [12]. В ряде работ показано протекторное влияние H_2S при различных патологических состояниях сердечно-сосудистой системы. Так показано, что при гипоксии предварительное введение H_2S увеличивает жизнеспособность кардиомиоцитов, а пропаргилглицин, являющийся ингибитором CSE, оказывает противоположный эффект. Кроме того, эндогенный H_2S оказывает кардиопротекторное действие у крыс при моделировании инфаркта миокарда [13].

Целью работы являлось исследование роли калиевых каналов в инотропных эффектах H_2S на миокарде крысы *Rattus norvegicus*.

Сократительную активность изолированной ткани миокарда в эксперименте *in vitro* у крысы исследовали на изолированных препаратах правого желудочка сердца. Эксперименты по определению сократимости миокарда проводились на установке Biopac Systems, Inc. (США), оснащенной изометрическим датчиком силы TSD 125C с диапазоном измерений 0-50 грамм.

Животное усыпляли при помощи ингаляционного наркоза изофлюраном. 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, содержащим в мМ: NaCl – 137,0; KCl – 5,0; Mg_2SO_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). В течении всего эксперимента в раствор в резервуаре обогащался карбогеном (97% O_2 и 3% CO_2). Препарат стимулировался электрическими сигналами через 2 платиновых электрода с помощью стимулятора ЭСЛ-2 (Россия) с частотой стимулов 0,1 Гц, амплитудой сигнала 40 мВ, продолжительность стимула 5 мс.

После погружения препарата в резервуар следовал период проработки в течение 40-60 минут. По окончанию приработки регистрировались исходные параметры сокращения. Фармакологические вещества не добавлялись до тех пор, пока не происходила стабилизация изометрического сокращения. После этого в течение 5 минут записывали исходные параметры сокращения полосок. Анализировали силу напряжения изолированных полосок миокарда. Достоверность

различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (U-тест).

В качестве донора H_2S использовали $NaHS$, так как в водных растворах он диссоциирует до иона натрия (Na^+) и гидросульфидного аниона (HS^-), который реагирует с протоном (H^+), образуя H_2S . Известно, что в физиологическом растворе одна треть H_2S находится в недиссоциированной форме, а остальные две трети существуют в виде HS^- [14].

Аппликация донора H_2S – $NaHS$ в низких концентрациях (1 и 10 мкМ) приводила к достоверному увеличению силы напряжения полоски миокарда (рис. 1) до $110,82 \pm 2,54\%$ ($n = 10$; $p < 0,001$) и $108,58 \pm 1,87\%$ ($n = 8$; $p < 0,001$) соответственно. Добавление $NaHS$ в более высоких концентрациях 50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ и 300 мкМ дозозависимо снижало силу напряжения относительно контрольного уровня до $83,72 \pm 4,23\%$ ($n = 8$; $p < 0,001$), $42,58 \pm 5,43\%$ ($n = 8$; $p < 0,001$), $40,89 \pm 6,39\%$ ($n = 16$; $p < 0,001$) и $38,56 \pm 7,31\%$ ($n = 10$; $p < 0,001$) соответственно (рис. 1). Отрицательный инотропный эффект $NaHS$ наблюдался с первых минут и выходил на плато к 15 мин аппликации. В дальнейших экспериментах использовали донор H_2S в концентрации 200 мкМ.

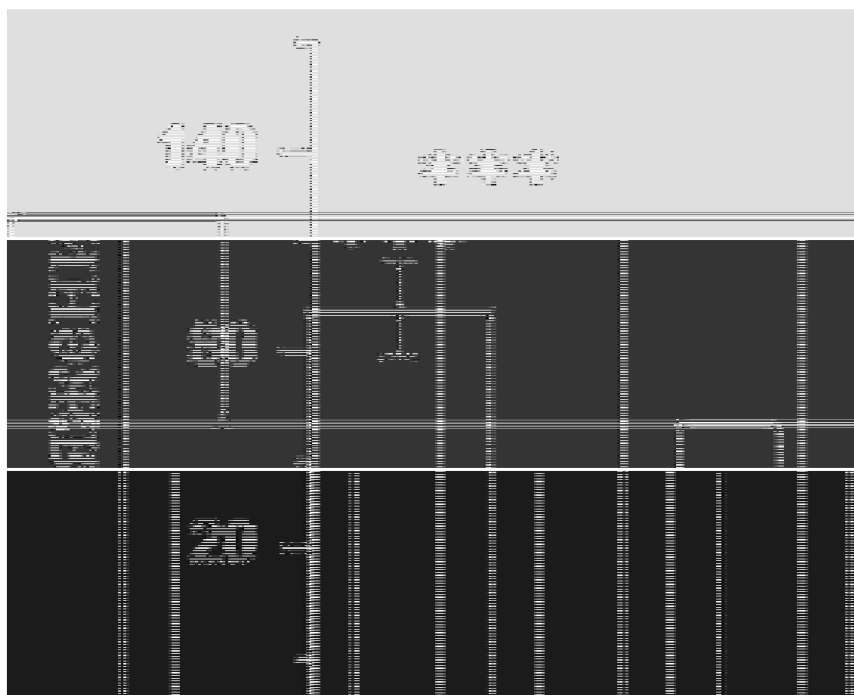


Рис. 1. Изменение силы напряжения в миокарде желудочка крысы при действии $NaHS$. *** – $p < 0,001$.

Для блокирования К-каналов использовали неселективный ингибитор тетраэтиламмоний хлористый (ТЭА) который наиболее эффективно увеличивал силу напряжения полоски миокарда в концентрации 15 мМ при которой сила напряжения составила

$132,14 \pm 6,68\%$ ($n = 10$; $p < 0,001$) от контрольного уровня (рис. 2). На фоне ингибирования К-каналов ТЭА отрицательный инотропный эффект NaHS сохранялся и составил $36,81 \pm 6,41\%$ ($n = 10$; $p < 0,01$) (рис. 2).

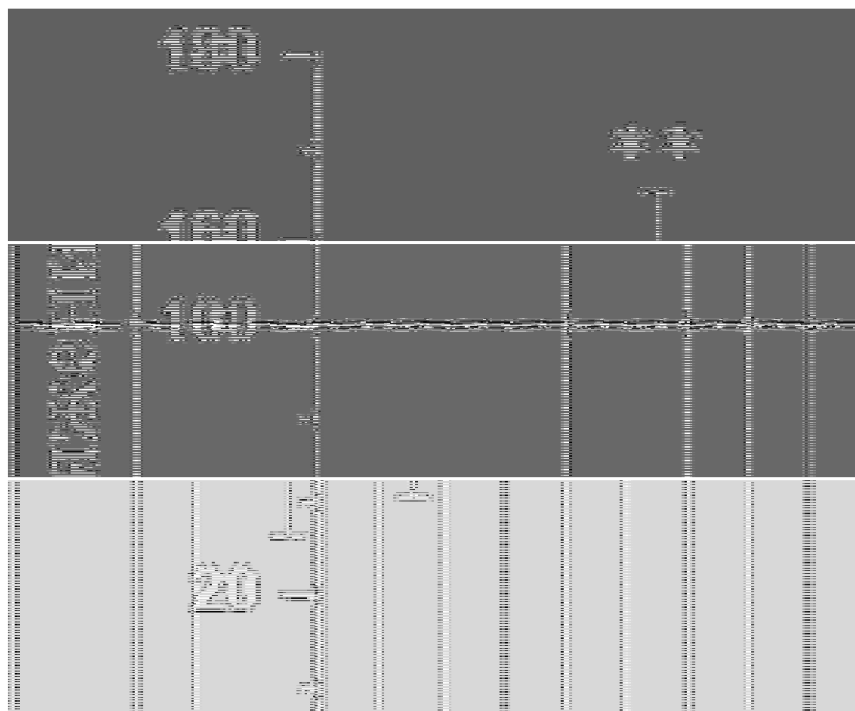


Рис. 2. Роль калиевых каналов в эффектах сероводорода на силу напряжения желудочкового миокарда крысы. *** – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,05$.

Одним из известных механизмов действия H_2S в гладких мышцах сосудов и кардиомиоцитах крысы является активация К(АТФ)-каналов [10,12]. Также показано роль этих каналов в опосредовании отрицательных инотропных эффектов H_2S на желудочковом миокарде у лягушки [15]. Для ингибирования К(АТФ)-каналов использовали глибенкламид, который в концентрации 50 мкМ приводил к недостоверному увеличению силы напряжения желудочкового миокарда до $117,29 \pm 4,46\%$ ($n = 3$; $p > 0,05$) относительно контрольных показателей. На фоне блокирования К(АТФ)-каналов отрицательный инотропный эффект NaHS сохранялся и составил $33,73 \pm 7,31\%$ ($n = 5$; $p < 0,05$) относительно контрольного уровня (рис. 2). Однако, глибенкламид восстанавливал амплитуду сокращения полоски миокарда в условиях ее снижения в ответ на аппликацию NaHS. При этом происходило достоверное увеличение амплитуды напряжения полоски миокарда до $156,56 \pm 9,34\%$ ($n = 5$; $p < 0,01$) относительно контрольных значений (рис. 2). Полученные данные указывают, что К(АТФ)-каналы участвуют в реализации отрицательного инотропного эффекта H_2S в миокарде крысы.

Полученные нами данные свидетельствуют, что экзогенный H_2S в зависимости от концентрации может оказывать как положительное

(в низких концентрациях), так и отрицательное инотропное действие (в высоких концентрациях). Подобное действие наблюдалось и гладкомышечных клетках сосудов, где низкие дозы H_2S вызывали вазоконстрикцию, 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 [17].

Известно, что целый ряд К-токов участвует в реполяризации мембраны кардиомиоцитов в различные фазы ПД [18]. На фоне блокирования К-каналов, при помощи неселективного блокатора ТЭА, эффекты донора H_2S полностью сохранялись. Одним из известных механизмов действия H_2S в гладких мышцах сосудов и кардиомиоцитах крысы является активация К(АТФ)-каналов [12]. На фоне блокирования этих каналов отрицательные эффекты донора на сократимость миокарда сохранялись. При этом глибенкалмид восстанавливал и даже вызывал увеличение силы напряжения желудочкового миокарда, сниженного предварительной аппликацией NaHS. По-видимому, в контрольных условиях активность К(АТФ)-каналов незначительна, а H_2S вызывает активацию данного типа каналов, что приводит к гиперполяризации и снижению длительности входящего Са-тока и уменьшению силы сокращения. В этих условиях проявляется ингибирующий эффект глибенкламида, что сопровождается деполяризацией мембраны и усилением сократимости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang R. // FASEB J. 2002. V. 16. P. 1792-8.
2. Elsey D., Fowkes R., Baxter G. // Cell Biochem. Funct. 2010. V. 28. P. 95-106.
3. Kimura H. // Redox. Signal. 2010. V. 12. P. 1111-23.
4. Sitdikova G., Weiger T., Hermann A. // Eur. J. Physiol. 2010. 459. P. 389-97.
5. Герасимова Е.В., Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. // Нейрохимия. 2008. Т. 25. № 1-2. С. 138-45.
6. Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. // Рос. Физиол. Ж. им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 97. № 7. С. 872-82.
7. Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. // Природа. 2010. Т. 9. С. 29-37.
8. Dombkowski R.A., Russell M.J., Olson K.R. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2004. V. 286. P. 678-85.
9. Dombkowski R.A., Russell M.J., Schulman A.A. et al. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2005. V. 288. P. 243-52.
10. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. // EMBO J. 2001. V. 20. P. 6008-16.
11. Kamoun P. // Amino Acids. 2004. V. 26. P. 243-54.
12. Geng B., Yang J., Qi Y. et al. // BBRC. 2004. V. 313. P. 362-8.
13. Zhu Y.Z., Wang Z.J., Ho P. et al. // J. Appl. Physiol. 2007. V. 102. P. 261-8.