

РОЛЬ СУЛЬФІДУ ВОДНЮ ТА СІРКОВІСНИХ АМІНОКИСЛОТ У РЕГУЛЯЦІІ ТОНУСУ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ СУДИННОЇ СТІНКИ У ЩУРІВ

Надійшла 26.02.10

У досліджах *in vitro* показано, що сульфід водню в діапазоні концентрацій 10^{-6} - 10^{-3} М викликав дозозалежну релаксацію кільцевих препаратів аорти, мезентеріальної та ниркової артерій. При підвищенні концентрації H_2S до 10^{-2} М спостерігалось посилення релаксуючого ефекту лише щодо препаратів мезентеріальної та ниркової артерій. Вазорелаксація стінок аорти, мезентеріальної та ниркової артерій, яку спричиняли аплікації цистеїну (10^{-6} - 10^{-2} М), повністю інгібувалася в присутності пропаргілгліцину. Гомоцистеїн у відносно високих концентраціях (10^{-4} - 10^{-2} М) викликав зменшення ендотеліальної вазорелаксації, індукованої ацетилхоліном. Найбільшу чутливість до гомоцистеїну мали ниркова та мезентеріальна артерії, найменшу – аорта. Преінкубація судин з L-NAME та індометацином зменшувала вазорелаксуючу дію сульфиду водню, тоді як преінкубація з натрію нітропрусидом таку дію посилювала.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: сульфід водню, гомоцистеїн, цистеїн, гладенькі м'язи, аорта, мезентеріальна та ниркова артерії.

ВСТУП

В останні роки було продемонстровано, що підвищений вміст гомоцистеїну в плазмі крові (гіпергомоцистеїнемія) є істотним самостійним фактором ризику розвитку та прогресування низки судинних захворювань. Цей стан є причетним до патологічного ремоделювання стану серця та судин, активації системного запалення в системі кровообігу, тромбоутворення тощо [1]. Нещодавно було також встановлено, що присутність іншої сірковмісної амінокислоти – цистеїну – у надмірно високих концентраціях асоціюється з розвитком ішемічної хвороби серця [2, 3].

Відомо, що дисбаланс у системі вазодилататори/вазоконстриктори відіграє важливу роль у прогресуванні кардіоваскулярних захворювань, таких, як артеріальна та легенева гіпертензії, шок, пошкодження міокарда різного генезу та ін. Одним із потужних вазорелаксуючих медіаторів, поряд з оксидом азоту та монооксидом вуглецю, є сульфід

водню (H_2S) [4]. Ця сполука утворюється в реакціях транссульфування гомоцистеїну та цистеїну в печінці та нирках за участю ферментів цистатіонін- γ -ліази, цистатіонін- β -синтази та цистеїнамінотрансферази, а також в ендотелії судин за участю цистатіонін- γ -ліази [5]. Достеменно відомо, що сульфід водню в певних концентраціях здатний істотно впливати на скорочувальну активність гладеньком'язових клітин [4]; одночасно не виключено, що H_2S може здійснювати також помітні впливи і на центральні нейронні механізми регуляції судинного тонузу [5, 6]. Чутливість гладеньких м'язів різних судин до H_2S у фізіологічних та аномально підвищених концентраціях поки не встановлена. Також невідомо, чи здійснюють цистеїн і гомоцистеїн власні впливи на тонус судинних стінок, чи їх вплив на тонус судин є опосередкованим дією H_2S , продукованим із даних амінокислот.

У нашій роботі ми намагалися з'ясувати впливи гомоцистеїну, цистеїну та сульфиду водню у фізіологічних та надлишкових концентраціях на тонус гладеньких м'язів стінок аорти, мезентеріальної та ниркової артерій щурів *in vitro*, а також визначити можливі механізми реалізації цих впливів.

¹ Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України (Україна).

Ел. пошта: anderneting@gmail.com (А. В. Мельник).

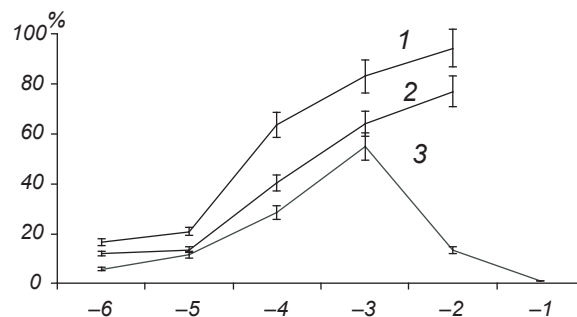
МЕТОДИКА

Досліди було проведено на 25 щурах-самцях ліній Вістар масою 350–400 г. Тварини перебували в стандартних умовах утримання та на раціоні віварію Вінницького національного медичного університету. Досліди виконували згідно з принципами гуманного відношення до експериментальних тварин, затвердженими комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України. Для евтаназії тварин використовували дислокацію шийних хребців. Ізольовані цілісні або деендотелізовані кільцеподібні фрагменти стінок аорти, ниркової та мезентеріальної артерій завширшки 2–3 мм вміщували в тефлонову камеру, розтягували на сталевих гачках та витримували протягом 60 хв в ізометричному режимі під постійним навантаженням 0.015–0.02 Н, суперфузуючи стандартним оксигенованим буферним розчином Кребса з постійною швидкістю 2.5–3.0 мл/хв [7, 8]. Деендотелізацію препаратів здійснювали механічно, обережно протираючи внутрішню поверхню судинного кільця за допомогою мініатюрного ватного тампона. Тонічне скорочення препаратів викликали з використанням аплікацій гіперкалієвого розчину Кребса (концентрація KCl 80 мМ) протягом 30 хв. З метою диференціації ендотелізалежного та ендотелійнезалежного розслаблення у фрагментів судин викликали передскорочення під дією розчину агоніста $\alpha 1$ -адренорецепторів фенілефрину (10^{-6} М), а потім оцінювали ступінь зменшення ізометричного напруження під впливом ацетилхоліну (10^{-6} М) або натрію нітропрусиду (10^{-7} М) відповідно. Реєстрацію скорочувальної активності проводили із застосуванням механотронного датчика та багатофункціонального аналогово-цифрового перетворювача USB-600-8/6009 („National Instruments”, США), з’єданого з персональним комп’ютером.

У роботі були використані індометацин, L-цистеїн, D,L-гомоцистеїн та пропаргілгліцин фірми „Sigma” (США), а також ацетилхолін, L-NAME, фенілефрин, ніфедипін, глібенкламід, натрію нітропрусид та натрію сульфід вітчизняного виробництва. Розрахунки середньої ефективної концентрації (EC_{50}) проводили відповідно до апроксимації S-подібними кривими отриманих експериментальних значень. Статистичну обробку результатів здійснювали із застосуванням комп’ютерної програми “MS Excel XP”.

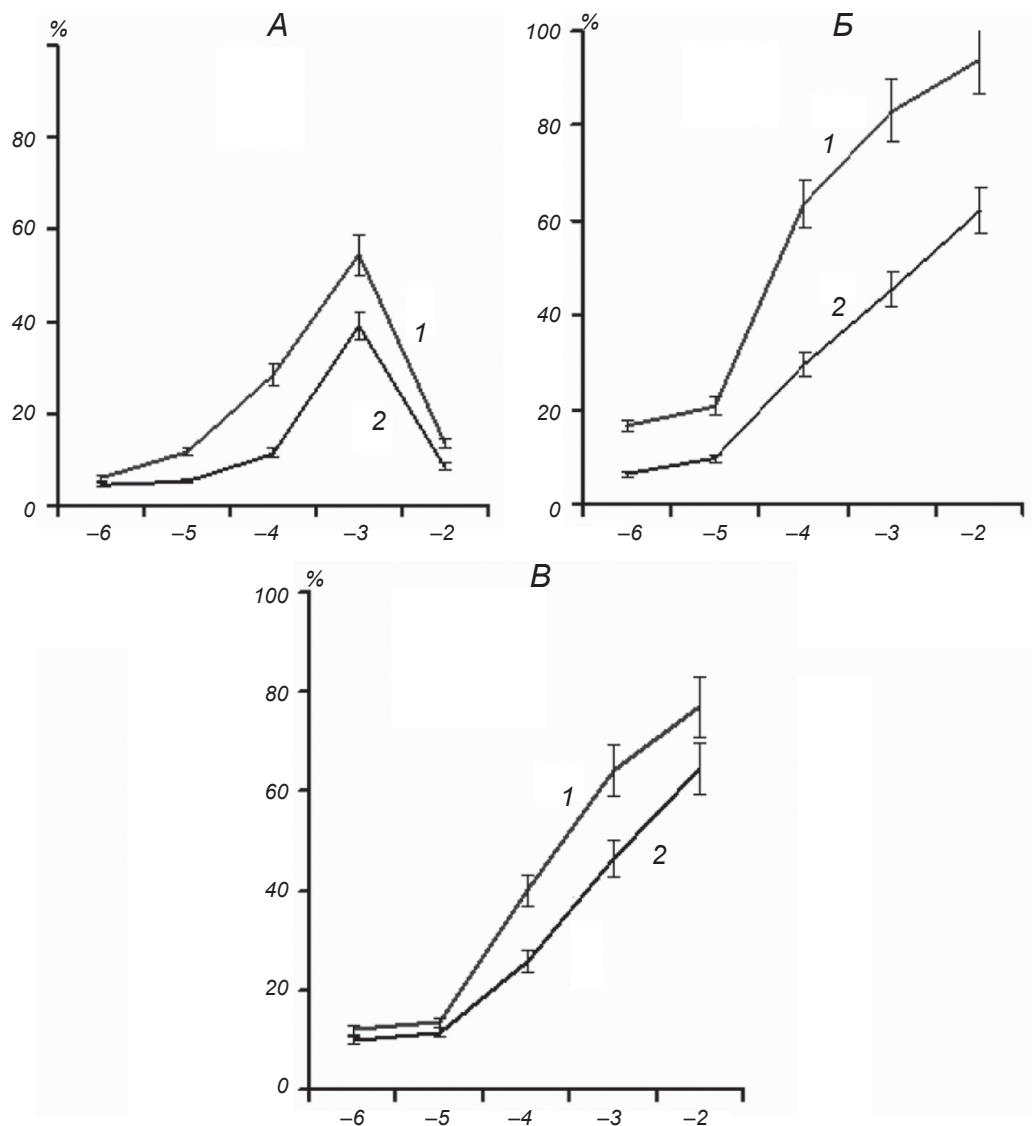
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як було встановлено, фрагменти стінок аорти, мезентеріальної та ниркової артерій, в котрих було викликано передскорочення під дією фенілефрину, демонстрували помітне зменшення ізометричного напруження в присутності донора сульфідів водню $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ в діапазоні концентрацій 10^{-6} – 10^{-2} М (рис. 1). Відомо, що сульфід натрію у водному розчині гідролізується, і в умовах використання зазначених концентрацій рівні сульфідів водню, продукованого таким чином, можна вважати рівними застосованим концентраціям Na_2S . У концентрації 10^{-6} М H_2S викликав лише незначне розслаблення препаратів аорти (у середньому на 5.79 %) та дещо виразніше розслаблення стінок ниркової та мезентеріальної артерій (відповідно на 12.1 та 16.5 %). При збільшенні концентрації сульфідів водню від 10^{-5} до 10^{-3} М спостерігалось посилення вазорелаксації у всіх досліджуваних судинних стінок, найбільш виражене в препаратах мезентеріальної та ниркової артерій. Коли ж концентрація H_2S збільшувалася до 10^{-2} М, впливи на досліджувані препарати судин ставали різноспрямованими. Зокрема, у препаратів мезентеріальної та ниркової артерій реєструвалось посилення вазодилатації, тоді як у фрагментах аорти ступінь вазодилатації наближався до такого при мінімальній концентрації сульфідів



Р и с. 1. Дозозалежність H_2S -стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів мезентеріальної (1), ниркової (2) артерій та аорти (3) щурів.

По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у суперфузійному розчині; по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів досліджуваних судин під впливом H_2S у зростаючих концентраціях, % (за 100 % прийнято рівень H_2S -стимульованого розслаблення досліджуваних кільцевих фрагментів судин, який за амплітудою відповідає максимальному значенню фенілефриніндукованого передскорочення). Наведено усереднені дані п'яти дослідів і значення похибок середнього.



Р и с. 2. Дозозалежність H_2S -стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів аорти (А), мезентеріальної (Б) та ниркової (В) артерій щурів в умовах наявності (1) та відсутності (2) ендотелію в тестованих препаратах. Позначення такі ж самі, як і на рис. 1.

ду водню (10^{-6} М). Іншими словами, у порівняно високих концентраціях H_2S його здатність викликати релаксацію стінки аорти істотно зменшувалась. Імовірним поясненням цього феномена можуть бути відмінності в особливостях механізмів регуляції тону судин досліджуваних нами судин. Так, регуляція тону гладеньких м'язів аорти здійснюється переважно за рахунок центральних механізмів, тоді як в ниркових та мезентеріальних артеріях домінує ауторегуляція [9]. Очевидно, H_2S у високих концентраціях зумовлює істотну стимуляцію хеморецепторів аорти, що зменшує здатність

стінки цієї судини до релаксації або навіть спричиняє протилежний (констрикторний) ефект. У той же час гладенькі м'язи ниркової та мезентеріальної артерій є більш чутливими до місцевих метаболічних регуляторних впливів і зберігають здатність до дилатації в присутності H_2S у «надфізіологічних» концентраціях. На нашу думку, в умовах цілісного організму H_2S все ж таки справляє односпрямовані впливи на тону м'язів стінок і аорти і ниркової та мезентеріальної артерій, оскільки в умовах норми вміст цього вазоактивного агента в плазмі крові та тканинах відповідає діапазону кон-

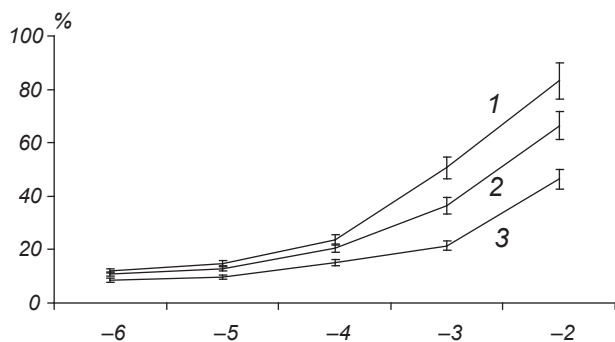


Рис. 3. Дозозалежність цистеїну (Цис) стимульованого розслаблення у кільцевих фрагментах мезентеріальної (1), ниркової (2) артерій та аорти (3) шурів.

По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації цистеїну (М) у суперфузійному розчині; по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів досліджуваних судин під впливом Цис у зростаючих концентраціях, % (за 100 % прийнято рівень Цис-стимульованого розслаблення досліджуваних кільцевих фрагментів судин, який за амплітудою відповідає максимальному значенню фенілефрину індукованого передсорочення). Дані п'яти дослідів. Решта позначень такі ж самі, що й на рис. 1.

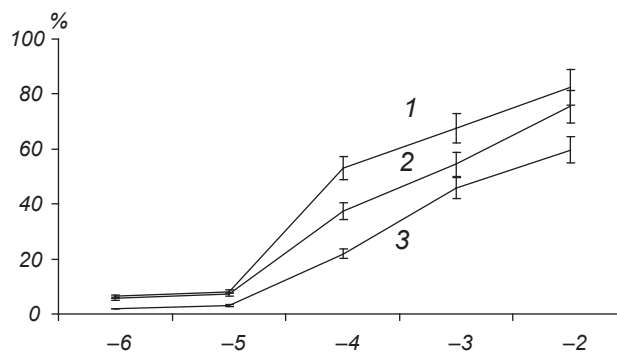


Рис. 4. Дозозалежність зменшення ацетилхолініндукованого розслаблення кільцевих фрагментів ниркової (1), мезентеріальної (2) артерій та аорти (3) шурів під впливом гомоцистеїну (Гц).

По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації Гц (М) у суперфузійному розчині; по осі ординат – нормована інтенсивність зменшення ацетилхолініндукованого розслаблення кільцевих фрагментів досліджуваних судин під впливом Гц у зростаючих концентраціях, % (за 100 % прийнято повне блокування ацетилхолініндукованого розслаблення досліджуваних кільцевих фрагментів судин під впливом Гц). Дані п'яти дослідів. Решта позначень такі ж самі, що й на рис. 1.

центрації 10^{-6} – 10^{-4} М [4]. Такі концентрації *in vitro* зумовлювали чітку дозозалежну дилатацію препаратів усіх досліджуваних судин.

Нами було встановлено половинні ефективні концентрації (EC_{50}) H_2S для препаратів різних судин. Цей параметр для аорти становив у середньому 91.6 ± 7.5 мкМ, а для ниркових та мезентеріальних артерій він був меншим відповідно в 1.2 та 2.27 рази. Отже, найбільшу чутливість до дії сульфідів водню продемонстрували гладенькі м'язи мезентеріальної артерії, дещо нижчу – ниркової артерії і найменшу – м'язи стінки аорти.

Як виявилось, ендотелій відіграє істотну роль у забезпеченні судинних ефектів сульфідів водню, оскільки в деендотелізованих препаратах судин спостерігалися помітно нижчі значення інтенсивності H_2S -індукованої вазодилатації. Про це свідчили зміщення кривих «доза–ефект» праворуч (рис. 2). У даному аспекті вагоміша роль ендотелію була притаманна судинним стінкам мезентеріальної та ниркової артерій. У разі відсутності ендотелію зменшення чутливості препаратів цих судин до вазорелаксуючої дії H_2S було більш виразним, ніж в аорті. Значення EC_{50} щодо H_2S для мезентеріальної та ниркової артерій у даному випадку були в 3.0 та 4.3 рази більшими, тоді як для деендотелізованої аорти – лише в 2.1 рази. Наведені факти дозволяють нам констатувати, що відповідно до збільшен-

ня здатності до релаксації під впливом H_2S досліджувані судини при наявності ендотелію можна розташувати таким чином: аорта < ниркова артерія < мезентеріальна артерія, тоді як в умовах деендотелізації виявлена закономірність змінюється на протилежну: мезентеріальна артерія < ниркова артерія < аорта. Отже, ендотелій відіграє важливу роль в реалізації судинних ефектів H_2S , особливо в тих судинах, де превалюють місцеві механізми регуляції тону м'язів стінок.

Для визначення можливого взаємозв'язку систем оксиду азоту та сульфідів водню в досліджуваних судинах ми тестували релаксуючу дію 10^{-3} М H_2S щодо препаратів інтактних судин та після їх преінкубації в присутності інгібітора синтази оксиду азоту L-NAME та донора оксиду азоту натрію нітропрусиду. Як виявилось, L-NAME (10^{-4} М) викликав зменшення H_2S -індукованого розслаблення препаратів аорти, мезентеріальної та ниркової артерій відповідно на 13.7, 19.2 та 20.1 % порівняно з аналогічним ефектом у інтактних препаратів судин. У той же час натрію нітропрусид (10^{-7} М) збільшував ступінь H_2S -зумовленого розслаблення в аорті, мезентеріальній та нирковій артеріях відповідно на 15.6, 16.6 та 17.1 %.

Відомо, що дія вазоактивних агентів на судинні м'язи значною мірою опосередковується впливами на іонні канали та ліпідні месенджери, зокрема

простагландини. Тому ми перевірили, як впливає на чутливість судинних стінок до H_2S експозиція використаних препаратів судин з інгібітором калієвих каналів K_{ATP} глібенкламідом, блокатором кальцієвих каналів L-типу ніфедипіном та інгібітором циклооксигенази індометацином. Виявилось, що після преінкубації з 10^{-5} М глібенкламіду H_2S -індуковане розслаблення препаратів аорти, мезентеріальної та ниркової артерій вірогідно зменшується – відповідно в 2.9, 1.6 та 1.95 разу. У той же час ніфедипін (10^{-5} М) практично не впливав на ізометричне розслаблення згаданих судин, викликане сульфідом водню. Очевидно, саме ATP -чутливі калієві канали є мембранними структурами, що опосередковують реалізацію H_2S -індукованої вазодилатації в усіх досліджуваних судинах (у найбільшій мірі – в аорті). Индометацин (10^{-5} М) знижував H_2S -індуковане розслаблення препаратів мезентеріальної та ниркової артерій відповідно на 19.9 та 18.2 %, а аорти – лише на 10.3 %. Отже, можна думати, що H_2S -індукована дилатація мезентеріальної та ниркової артерій у більшій мірі, ніж дилатація аорти, реалізується через вплив на ліпідні месенджери.

На наступному етапі ми визначали вплив сірковмісних амінокислот цистеїну та гомоцистеїну на скоротливість досліджуваних судин. Цистеїн продемонстрував вазорелаксуючі властивості, причому ефект був дозозалежним (рис. 3). При концентрації цистеїну 10^{-6} М розслаблення препаратів аорти, ниркової та мезентеріальної артерій було подібним за інтенсивністю, складаючи приблизно 12 %, при концентрації ж 10^{-2} М реєструвалось істотніше розслаблення цих судин – на 48.1, 66.4 та 83.2 % відповідно. Величини EC_{50} цистеїну для препаратів аорти, ниркової та мезентеріальної артерій становили 1110 ± 49 , 811 ± 43 та 525 ± 37 мкМ відповідно. Отже, мезентеріальна артерія виявилася найбільш чутливою до вазорелаксуючої дії цистеїну.

Відомо, що утворення H_2S в ендотелії судин відбувається внаслідок деградації цистеїну за участю цистатіонін- γ -ліази (цистеїн + $H_2O \rightarrow$ піруват + H_2S + NH_3) [4]. Тому не можна виключити, що вазорелаксуюча дія цистеїну практично цілком реалізується за рахунок продукції сульфїду водню з цієї амінокислоти. Для перевірки даної гіпотези ми досліджували вплив інгібітора цистатіонін- γ -ліази пропаргілгліцину (50 мкМ) на цистеїніндуковану вазодилатацію. Виявилось, що зазначений агент майже повністю нівелював вазорелаксуючий ефект цистеїну в усіх досліджуваних препаратах судин.

Як було встановлено, гомоцистеїн у відносно високих концентраціях справляє непряму вазоконстрикторну дію; ефект реалізується через пригнічення ендотелійзалежної вазорелаксації. Преінкубація аорти в середовищі з гомоцистеїном у досить низьких концентраціях (10^{-6} – 10^{-5} М) не впливала на ацетилхолініндуковану вазорелаксацію, тоді як гомоцистеїн у більш високих концентраціях (10^{-4} – 10^{-2} М) забезпечував досить помітне дозозалежне зменшення вазорелаксуючої дії ацетилхоліну (рис. 4). У той же час преінкубація судин з гомоцистеїном не справляла дії на ендотелійнезалежну вазорелаксацію, індуковану натрію нітропрусидом. Значення EC_{50} гомоцистеїну для препаратів аорти, мезентеріальної та ниркової артерій у середньому становили відповідно 137 ± 9.2 , 94.5 ± 5.8 та 77.4 ± 5.2 мкМ, тобто найбільш чутливими до вазоконстрикторної дії гомоцистеїну є гладенькі м'язи ниркової артерії (їх чутливість була майже вдвічі більшою, ніж у м'язів аорти).

Отримані нами дані підтверджують наявність у сульфїду водню досить потужних прямих вазорелаксуючих властивостей. Найбільш чутливими до дії H_2S є м'язи стінок мезентеріальної та ниркової артерій, котрі демонстрували чітку дозозалежну релаксацію. Як ми показали, вазорелаксуюча дія сульфїду водню реалізується не лише через вплив названого агента на ATP -чутливі калієві канали гладеньких м'язів (про що повідомлялося раніше [6]), а й через взаємодію H_2S з ендотеліальними факторами релаксації (оксидом азоту, простагліцином та ін.). При цьому внесок зазначених шляхів H_2S -індукованої вазорелаксації помітно різниться залежно від типу судин. Так, вплив H_2S на тонус стінок аорти в більшій мірі пов'язаний саме з активацією ATP -чутливих калієвих каналів відповідних гладеньких м'язів. Натомість вплив H_2S на мезентеріальну та ниркову артерії опосередковується переважно ендотеліальним компонентом. Ми продемонстрували, що цистеїн викликає дозозалежну вазорелаксацію, причому вона реалізується головним чином через продукцію сульфїду водню в ендотелії судин. Підтвердженням цього є інгібування такої вазорелаксації під впливом пропаргілгліцину. Гомоцистеїн у високих концентраціях демонструє непряму вазоконстрикторну дію за рахунок зниження ендотеліальної ацетилхолінопосередкованої вазорелаксації. Слід очікувати, що лише за умов істотної гіпергомоцистеїнемії, коли рівень гомоцистеїну зростає в десятки разів, вазоконстрикторна дія цієї амінокислоти може якимось чином реалізуватися.

Результати нашої роботи створюють певне підґрунтя для подальших експериментальних та клінічних досліджень, які спрямовані на встановлення патогенетичного значення розладів обміну сірковмісних амінокислот в умовах патологічних станів, асоційованих з порушеннями судинного тону-су. При цьому зрозуміло, що необхідні як подальше вивчення периферичних прямих впливів сульфідів водню та сірковмісних амінокислот на гладенькі м'язи судинних стінок, так і визначення центральних ефектів даних агентів щодо стовбурових нейронних систем, задіяних у регуляцію судинного тону-су.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. О. О. Пентюк, М. Б. Луцюк, І. І. Андрушко, К. П. Постовітенко, "Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології", *Укр. біохім. журн.*, **75**, № 1, 5-17 (2003).
2. І. І. Андрушко, "Вміст цистеїну у практично здорових осіб та пацієнтів з ішемічною хворобою серця", *Укр. кардіол. журн.*, № 3, 43-47 (2007).
3. M. H. Stipanuk, J. E. Dominy Jr, J. I. Lee, and R. M. Coloso, "Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism," *J. Nutr.*, **136**, No. 6, 1652-1659 (2006).
4. W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, and R. Wang, "The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener," *EMBO J.*, **20**, No. 21, 6008-6016 (2001).
5. E. Łowicka and J. Beltowski, "Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists," *Pharmacol. Reports*, **59**, No. 1, 4-24 (2007).
6. R. Wang, "Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?" *FASEB J.*, **16**, No. 13, 1792-1780 (2002).
7. А. В. Гурковская, В. А. Бурый, Н. И. Гокина, М. Ф. Шуба, "Электрофизиологический анализ возбуждающего действия серотонина на коронарные артерии", *Физиол. журн.*, **34**, № 5, 66-72 (1998).
8. М. М. Ткаченко, В. Ф. Сагач, О. В. Базілюк та ін., "Вікові особливості змін скорочувальних судинних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування у зоні відчуження", *Фізіол. журн.*, **51**, № 3, 32-41 (2005).
9. Г. Е. Ройтберг, А. В. Струтынский, *Внутренние болезни. Сердечно-сосудистая система*, Медицина, Москва (2003).