

УДК 612.172:546.221.1]-092.9

ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРЕДСЕРДИЯ МЫШИ В КОНТРОЛЕ И В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Лифанова А.С.¹, Яковлева О.В.¹, Зефирова А.Л.², Ситдикова Г.Ф.¹¹ Казанский федеральный университет, г. Казань² Казанский государственный медицинский университет, г. Казань

РЕЗЮМЕ

Сероводород (H_2S) является эндогенно синтезируемым газообразным посредником, который был обнаружен в качестве регулятора сердечно-сосудистой системы. Сахарный диабет (СД) ведет к увеличению риска развития гипертензии и сердечно-сосудистых заболеваний, поэтому целью исследования явился анализ сократительной функции предсердий мыши в ответ на аппликацию L-цистеина и H_2S . Сократительную активность миокарда в эксперименте *in vitro* исследовали на изолированных предсердиях мыши. Для моделирования СД использовали аллоксан. Внутривенная инъекция аллоксана приводила к достоверному повышению концентрации глюкозы в крови, которая при инъекции физиологического раствора достоверно не увеличивалась. В контроле добавление NaHS приводило к достоверному дозозависимому снижению амплитуды сокращения миокарда, тогда как в условиях моделирования СД отрицательный инотропный эффект NaHS был достоверно ниже, чем в контрольных условиях. В контроле L-цистеин достоверно уменьшал амплитуду сокращения, тогда как в условиях моделирования СД L-цистеин в тех же концентрациях не приводил к достоверным изменениям амплитуды сокращения. Полученные данные свидетельствуют о том, что чувствительность предсердия мыши к H_2S и субстрату его синтеза L-цистеину заметно снижается в условиях моделирования СД.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сероводород, предсердия мыши, L-цистеин, сахарный диабет, аллоксан.

Введение

Сероводород (H_2S) является эндогенно синтезируемым газообразным посредником, который был обнаружен в качестве регулятора сердечно-сосудистой системы наряду с оксидом азота и монооксидом углерода [1]. В различных тканях H_2S синтезируется из L-цистеина ферментами цистатионин γ -лиаза (ЦГЛ), цистатионин- β синтаза (ЦБС) и 3-меркаптосульфотрансфераза (3-МКТ) [1]. В сердечно-сосудистой системе за синтез H_2S главным образом отвечает фермент ЦГЛ, который обеспечивает эндогенную продукцию H_2S [4]. ЦБС и ЦГЛ экспрессируются в островковых клетках поджелудочной железы мыши [5]. H_2S оказывает расслабляющее влияние на гладкую мускулатуру, в частности на сосудистую, что имеет огромное значение для поддержания артериального давления [6, 7]. Имеются данные о кардиопротекторной роли H_2S , выражающейся в уменьшении повреж-

дений миокарда в условиях ишемии (реперфузии) в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [3, 8]. Диабет является хроническим нарушением обмена веществ, что влияет на метаболизм углеводов и других веществ в результате нарушения секреции инсулина и (или) из-за резистентности к инсулину. Существует ряд доказательств того, что при развитии диабета происходит нарушение метаболизма серосодержащих аминокислот, таких как метионин, гомоцистеин, L-цистеин, а также продукции H_2S [9–11].

В связи с тем что сахарный диабет (СД) ведет к увеличению риска развития гипертензии и сердечно-сосудистых заболеваний, целью исследования явился анализ сократительной функции предсердий мыши в ответ на аппликацию цистеина и сероводорода.

Материал и методы

Эксперименты по регистрации сократимости проводились на предсердиях мыши на установке Biopac Systems Inc. (США). Мышей декапитировали под эфирным наркозом и производили препаровку – быстро вскрывали грудную клетку и выделяли предсердия,

✉ Лифанова Анастасия Сергеевна, e-mail: las911@rambler.ru

которые подвешивали вертикально в ванночке объемом 20 мл. Снизу предсердие жестко фиксировали к блоку, верхний конец соединяли с тензометрическим датчиком TSD125C (Biopac Systems, Inc., США) с диапазоном чувствительности 0–50 г.

В течение эксперимента препарат омывался раствором Кребса следующего состава (в ммоль): NaCl – 154, KCl – 5, CaCl₂ – 2, MgSO₄ – 1, глюкоза – 11 (*t* = 20 °С, pH 7,2–7,4). Раствор Кребса перфузировали карбогеном в течение всего эксперимента. Препарат стимулировали электрическими импульсами через два 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 приработки в течение 40–60 мин, в ходе которого мышечным волокнам постепенно придавалось оптимальное напряжение.

Запись кривой сокращения регистрировали на персональном компьютере при помощи программного обеспечения Elf (автор А.В. Захаров). Достоверность различий определяли с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при уровне *p* < 0,05.

В качестве донора H₂S использовали гидросульфид натрия (NaHS), так как в водном растворе он диссоциирует до Na²⁺ и HS⁻, затем HS⁻ связывается с H⁺ с образованием H₂S. В нейтральном растворе одна треть NaHS находится в виде газа H₂S, а оставшиеся две трети в виде HS⁻ [12]. В экспериментах также использовали L-цистеин в качестве субстрата синтеза H₂S.

Для создания модели СД использовали аллоксан (Sigma, США) в концентрации 200–250 мг/кг массы тела. Уровень сахара крови определялся перед введением аллоксана и каждые 10 сут глюкометром Accu-Chek Active. Для развития СД животных содержали на протяжении 45 сут. Кровь для анализа уровня глюкозы, брали из хвостовой вены. Все используемые реактивы производства фирмы Sigma (США).

Результаты и обсуждение

Влияние аллоксана на концентрацию глюкозы в крови экспериментальных мышей. Для моделирования СД мышам после суточного голодания внутривенно инъецировали аллоксан (200–250 мг/кг массы тела). Аллоксан обладает избирательной токсичностью к β-клеткам островков Лангерганса поджелудочной железы. Известно, что аллоксан имеет два механизма действия на ткань поджелудочной железы: селективно ингибирует глюкозозависимую секрецию инсулина через ингибирование глюкокиназы, сенсора

глюкозы в β-клетках и вызывает образование свободных радикалов, в результате чего наблюдается некроз этих клеток [13]. В контроле (*n* = 55) концентрация глюкозы составляла (3,5 ± 1,0) ммоль/л, после инъекции препарата на 10-е и 20-е сут у мышей опытной группы наблюдалось недостоверное повышение концентрации глюкозы (*p* > 0,05), а начиная с 30-х сут концентрация глюкозы достоверно отличалась от контрольных значений, полученных у мышей с инъекцией физиологического раствора. На 45-е сут животных из опыта брали для исследований.

Влияние донора H₂S на амплитуду сокращения миокарда. Для исследования эффектов экзогенного H₂S использовали донор NaHS, который кумулятивно апплицировали на препарат предсердия мыши в концентрациях 100, 200 и 300 мкмоль. В контроле добавление NaHS приводило к дозозависимому снижению амплитуды сокращения миокарда на (15 ± 3) % (*n* = 14, *p* < 0,05), (41 ± 6) % (*n* = 14, *p* < 0,05) и (61 ± 4) % (*n* = 15, *p* < 0,05) соответственно (рис. 1). В условиях моделирования сахарного диабета первого типа после аппликации NaHS амплитуда сокращения изменялась на (2 ± 2) % (*n* = 6, *p* > 0,05), (6 ± 4) % (*n* = 5, *p* > 0,05), (46 ± 12) % (*n* = 5, *p* < 0,05), что достоверно отличается от контрольных значений для концентраций 100 и 200 мкмоль (рис. 1). Таким образом, в условиях моделирования СД отрицательный инотропный эффект NaHS был достоверно ниже, чем в контрольных условиях.

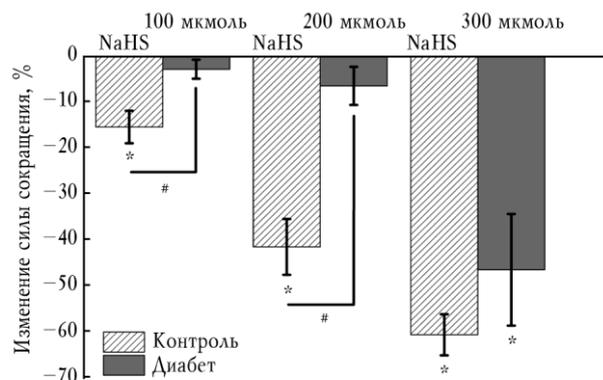


Рис. 1. Влияние NaHS на сократимость предсердий мыши в контроле и условиях моделирования сахарного диабета. * – *p* < 0,05 – по отношению к исходным значениям; # – *p* < 0,05 – между эффектами NaHS в контроле и в условиях моделирования сахарного диабета

Влияние субстрата синтеза H₂S на амплитуду сокращения миокарда. L-цистеин является основным субстратом синтеза H₂S в тканях. В контроле добавление L-цистеина в концентрациях 1, 10, 50 мкмоль приводило к достоверному уменьшению амплитуды

сокращения до $(95 \pm 1) \%$ ($n = 7$, $p < 0,05$), $(94 \pm 1) \%$ ($n = 6$, $p < 0,05$), $(88 \pm 3) \%$ ($n = 6$, $p < 0,05$), соответственно (рис. 2). В условиях моделирования сахарного диабета аппликация L-цистеина в тех же концентрациях не приводила к достоверным изменениям амплитуды сокращения, которая составила $(99 \pm 1) \%$ ($n = 6$, $p > 0,05$), $(98 \pm 2) \%$ ($n = 6$, $p > 0,05$), $(98 \pm 2) \%$ ($n = 6$, $p > 0,05$) (рис. 2).

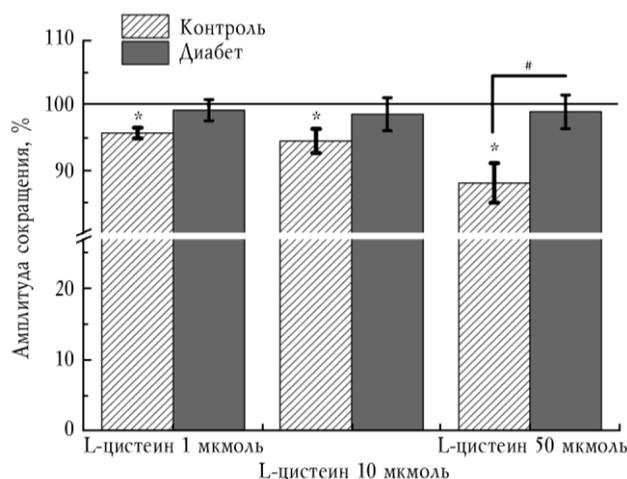


Рис. 2. Влияние L-цистеина на сократимость предсердий мыши в контроле и условиях моделирования сахарного диабета. * – $p < 0,05$ – по отношению к исходным значениям; # – $p < 0,05$ – между эффектами цистеина в контроле и в условиях моделирования сахарного диабета

Заключение

Таким образом, показано, что чувствительность предсердия мыши к H_2S и субстрату его синтеза L-цистеину заметно снижается в условиях моделирования сахарного диабета. Из литературных источников известно, что синтез H_2S значительно повышается у крыс при моделировании сахарного диабета стрептозотоцином [11], при этом показано двухфазное влияние H_2S на клетки поджелудочной железы, в низких концентрациях H_2S ингибировал высвобождение инсулина [14]. Однако также было выявлено, что реактивность сосудов, уровень H_2S в плазме, сосудистый синтез H_2S при моделировании сахарного диабета у мышей снижаются [10]. Эти данные подтверждаются наблюдениями об уровне сульфидов в плазме у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и у гипертензивных крыс. В наших экспериментах было показано, что в условиях развития сахарного диабета не проявляется эффект L-цистеина – субстрата синтеза H_2S – на сократительную функцию предсердия мыши, что, по-видимому, может быть связано с нарушением работы

фермента CSE. При этом мы также наблюдали меньшую реакцию предсердия на экзогенную аппликацию донора H_2S , что указывает на изменение чувствительности мишеней действия газа в условиях моделирования сахарного диабета. Дальнейшие исследования позволят выявить механизмы нарушения регуляции сократительной функции предсердий H_2S и другими газомедиаторами.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-97081/12.

Литература

1. Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. Сероводород: от канализации Парижа к сигнальной молекуле // Природа. 2010. № 9. С. 29–37.
2. Hermann A., Sitdikova G.F., Weiger T. Gasotransmitter fluchtige Ubertragerstoffe // Arzte Woche, Springer Medizin. 2010. № 42. P. 10.
3. Gadalla M.M., Snyder S.H. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter // J. Neurochem. 2010. 113 (1). P. 14–26.
4. Zhao W., Zhang J., Lu Y. et al. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K(ATP)-channel opener // EMBO J. 2001. 20. P. 6008–6016.
5. Yukiko Kaneko, Yuka Kimura, Hideo Kimura, Ichiro Niki. L-Cysteine Inhibits Insulin Release From the Pancreatic β -Cell. Possible Involvement of Metabolic Production of Hydrogen Sulfide, a Novel Gasotransmitter // Diabetes. 2006. V. 55. P. 1391–1397.
6. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? // FASEB J. 2002. 16. P. 1792–1798.
7. Yang G., Wu L., Jiang B. et al. H_2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase // Science. 2008. 322. P. 587–590.
8. Geng B., Yang J., Qi Y., Zhao J., Pang Y., Du J., Tang C. H_2S generated by heart in rat and its effects on cardiac function // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 313. P. 362–368.
9. Herrmann W., Schorr H., Obeid R., Makowski J., Fowler B., Kuhlmann M.K. Disturbed homocysteine and methionine cycle intermediates S-adenosyl-homocysteine and S-adenosylmethionine are related to degree of renal insufficiency in type 2 diabetes // Clin. Chem. 2005. 51. P. 891–897.
10. Brancaleone V., Roviezzo F., Vellecco V., De Gruttola L., Bucci M., Cirino G. Biosynthesis of H_2S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice // British Journal of Pharmacology. 2008. 155. P. 673–680.
11. Yusuf M., Huat B.T.K., Hsu A., Whiteman M., Bhatia M., Moore P.K. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. 333. P. 1146–1152.
12. Beauchamp R.O. Jr, Bus J.S., Popp J.A., Boreiko C.J., Andjelkovich D.A. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity // Crit. Rev. Toxicol. 1984. 13 (1). P. 25–97.
13. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-

- induced diabetes // *Diabetologia*. 2008. 51 (2). P. 216–226.
14. Ali M.Y., Whiteman M., Low C.M., Moore P.K. Hydrogen sulphide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a KATPchannel-dependent pathway // *J. Endocrinol.* 2007.

195. P. 105–112.
15. Yang G., Yang W., Wu L., Wang R. H₂S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells // *J. Biol. Chem.* 2007. 292. P. 16567–16576.

Поступила в редакцию 01.11.2014 г.

Утверждена к печати 12.11.2014 г.

Лифанова Анастасия Сергеевна (✉) – аспирант, Казанский федеральный университет (г. Казань).

Яковлева Ольга Владиславовна – канд. наук, ст. преподаватель, Казанский федеральный университет (г. Казань).

Зефилов Андрей Львович – д-р наук, профессор, член-корреспондент РАМН, зав. кафедрой, Казанский государственный медицинский университет (г. Казань).

Ситдикова Гузель Фаритовна – д-р наук, профессор, зав. кафедрой, Казанский федеральный университет (г. Казань).

✉ **Лифанова Анастасия Сергеевна**, e-mail: las911@rambler.ru

EFFECT OF HYDROGEN SULFIDE ON ATRIUM CONTRACTILITY IN CONTROL AND DIABETHIC MICE

Lifanova A.S.¹, Yakovleva O.V.¹, Zefirov A.L.², Sitdikova G.F.¹

¹ *Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation*

² *Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation*

ABSTRACT

Hydrogen sulfide (H₂S) is endogenously synthesized gasotransmitter that has a regulatory effect in cardiovascular system. Diabetes mellitus leads to an increased risk of hypertension and cardiovascular diseases, so the purpose of the study was to analyze the contractility of the atria mice after application of L-cysteine and H₂S. Contractile activity of the myocardium was investigated in the experiment on isolated mouse atria. Alloxan was used for modeling diabetes. Intraperitoneal injection of alloxan resulted in a significant increase of glucose concentration in blood, whereas the concentration of glucose didn't change at the injection of physiological solution. In control, the addition of NaHS resulted in a significant dose-dependent decrease of the amplitude of contraction of the myocardium, whereas the negative inotropic effect of NaHS was significantly lower in terms of modeling diabetes compare to control conditions. In the control, L-cysteine reduced the amplitude contractions significantly, whereas L-cysteine did not lead to significant changes in the amplitude of contractions in terms of modeling diabetes. These data indicate that the sensitivity of mice's atria reduced for H₂S and L-cysteine in diabetes mellitus.

KEY WORDS: hydrogen sulfide, mouse atrium, L-cysteine, diabetes, alloxan.

Bulletin of Siberian Medicine, 2014, vol. 13, no. 6, pp. 155–159

References

- Sitdikova G.F., Zefirov A.L. Serovodorod: ot kanalizacij Parizha k signal'noj molecule. *Priroda*, 2010, no. 9, pp. 29–37 (in Russian).
- Hermann A., Sitdikova G.F., Weiger T. Gasotransmitter fluchtige Ubertragerstoffe. *Arzte Woche, Springer Medizin*, 2010, no. 42, p. 10.
- Gadalla M.M., Snyder S.H. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J. Neurochem.*, 2010, 113 (1), pp. 14–26.
- Zhao W., Zhang J., Lu Y. *et al.* The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP)-channel opener. *EMBO J.*, 2001, 20, pp. 6008–6016.
- Yukiko Kaneko, Yuka Kimura, Hideo Kimura, Ichiro Niki.

- L-Cysteine Inhibits Insulin Release From the Pancreatic β -Cell. Possible Involvement of Metabolic Production of Hydrogen Sulfide, a Novel Gasotransmitter. *Diabetes*, 2006, vol. 55, pp. 1391–1397.
6. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.*, 2002, 16, pp. 1792–1798.
 7. Yang G., Wu L., Jiang B. *et al.* H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science*, 2008, 322, pp. 587–590.
 8. Geng B., Yang J., Qi Y., Zhao J., Pang Y., Du J., Tang C. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 313, pp. 362–368.
 9. Herrmann W., Schorr H., Obeid R., Makowski J., Fowler B., Kuhlmann M.K. Disturbed homocysteine and methionine cycle intermediates S-adenosyl-homocysteine and S-adenosylmethionine are related to degree of renal insufficiency in type 2 diabetes. *Clin. Chem.*, 2005, 51, pp. 891–897.
 10. Brancalione V., Roviezzo F., Vellecco V., De Gruttola L., Bucci M., Cirino G. Biosynthesis of H₂S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 155, pp. 673–680.
 11. Yusuf M., Huat B.T.K., Hsu A., Whiteman M., Bhatia M., Moore P.K. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 333, pp. 1146–1152.
 12. Beauchamp R.O. Jr, Bus J.S., Popp J.A., Boreiko C.J., Andjelkovich D.A. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, 1984, 13 (1), pp. 25–97.
 13. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 2008, 51 (2), pp. 216–226.
 14. Ali M.Y., Whiteman M., Low C.M., Moore P.K. Hydrogen sulphide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a KATPchannel-dependent pathway. *J. Endocrinol.*, 2007, 195, pp. 105–112.
 15. Yang G., Yang W., Wu L., Wang R. H₂S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells. *J. Biol. Chem.*, 2007, 292, pp. 16567–16576.

Lifanova Anastasia S. (✉), Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation.

Yakovleva Olga V., Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation.

Zefirov Andrey L., Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation.

Sitdikova Guzel F., Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation.

✉ **Lifanova Anastasia S.**, e-mail: las911@rambler.ru