

УДК 612.111:577.352.4:546.221.1

DOI 10.20538/1682-0363-2016-3-79–86

Для цитирования: Петрова И.В., Розенбаум Ю.А., Бирулина Ю.Г. и др. Влияние сероводорода на Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов человека. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15(3): 79–86

Влияние сероводорода на Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов человека

Петрова И.В., Розенбаум Ю.А., Бирулина Ю.Г., Ковалев И.В., Гусакова С.В.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – изучить влияние донора сероводорода NaHS на изменения мембранного потенциала эритроцитов, вызванные активацией Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов в присутствии кальциевого ионофора либо искусственной электронно-донорной системы аскорбат – феназинметосульфат (ФМС).

Материал и методы. В работе использовались упакованные эритроциты, полученные из венозной крови 25 здоровых добровольцев в возрасте 20–27 лет. Регистрацию мембранного потенциала эритроцитов в присутствии Ca^{2+} -ионофора (A23187) или искусственной электронно-донорной системы аскорбат – ФМС проводили потенциометрическим методом, основанным на том, что в присутствии протонофора распределение H^+ зависит от мембранного потенциала E_m как $E_m = RT/F (pH_i - pH_0)$, где pH_i и pH_0 – значения pH цитоплазмы и среды инкубации соответственно. В качестве интегральной характеристики Ca^{2+} -зависимой K^+ -проницаемости эритроцитов рассчитывали амплитуду гиперполяризационного ответа (ГО).

Результаты. Установлено, что добавление в среду инкубации клеток NaHS в концентрациях от 0,005–0,2 мМ вызывало изменение амплитуды гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов, вызванного обоими способами. В присутствии 0,005 мМ NaHS амплитуда A23187-зависимого ГО существенно увеличивалась, тогда как амплитуда редокс-зависимого ГО снижалась. Подавление A23187-зависимого ГО в присутствии более высоких концентраций NaHS было более выраженным, чем редокс-зависимого. Амплитуда A23187-зависимого ГО при совместном действии сероводорода и блокатора $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта (НКСС) буметанида увеличивалась, редокс-зависимого ГО снижалась по сравнению с параметром, полученном в отсутствии блокатора.

Заключение. Установлено, что сероводород оказывает модулирующее действие на $\text{K}(\text{Ca}^{2+})$ -каналы мембраны эритроцитов. Эффект H_2S зависит от способа активации исследуемых каналов. A23187-зависимый ГО оказался более чувствителен к H_2S по сравнению с редокс-индуцированным ГО мембраны эритроцитов. Влияние NaHS на амплитуду ГО в присутствии блокатора НКСС буметанида также зависело от способа стимуляции канала.

Ключевые слова: сероводород, эритроциты, Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы.

Введение

Открытие Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов ($\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналы) связано с обнаружением так называемого Gardos-эффекта: предотвращение ЭДТА утечки ионов K^+ из АТФ-истощенных эритроцитов [1], который основан на хелатировании ЭДТА ионов кальция, что препятствует их накоплению в цитоплазме клеток. Впоследствии

оказалось, что при любых воздействиях, уменьшающих содержание АТФ в цитозоле клеток, увеличение проницаемости эритроцитов для ионов калия коррелирует с уровнем накопления ^{45}Ca в клетке [2].

Со времени своего обнаружения $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналы эритроцитов, которые относятся к каналам средней проводимости (intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^+ -channel, ИКСа) [3], достаточно интенсивно изучаются, но только недавно была установлена их физиологическая роль.

✉ Петрова Ирина Викторовна, e-mail: ivpetrova57@yandex.ru

$\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналы вносят определенный вклад в эриптоз [4], изменение объема клеток [5]. Не исключено их участие в деформируемости клеток: Ca^{2+} -индуцируемое снижение деформируемости эритроцитов устраняется вследствие выравнивания градиента ионов калия или обработки клеток блокатором этих каналов [6, 7].

Регуляция $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов эритроцитов осуществляется несколькими путями. Один из них связан с вторичными посредниками, эффект которых реализуется при воздействии активаторов или ингибиторов протеинкиназ А или С [8, 9, 10]. Другой путь регуляции осуществляется посредством белков цитоскелета эритроцитов без участия протеинкиназ [11].

Наконец мембрана эритроцитов содержит некоторые компоненты электронно-транспортной цепи, обычно присутствующие на внутренней мембране митохондрий (НАДН-дегидрогеназа, цитохром С) [12, 13], которые могут включаться в регуляцию $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов эритроцитов [12].

В последнее время пристальное внимание исследователей привлекает новый класс регуляторных молекул, а именно газовые посредники, к которым относят монооксиды азота и углерода, сульфид водорода, образующиеся в клетках организма. Молекулы газов свободно проникают через биологические мембраны, их синтез регулируется определенными ферментами, они осуществляют как межклеточную, так и внутриклеточную регуляцию различных физиологических функций [14]. Известны данные о роли NO [6] в регуляции Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов эритроцитов. Работы о регуляторной роли CO и H_2S относительно Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов единичны.

Кровь человека содержит существенное количество сероводорода: 10–100 мкМ H_2S [15]. Кроме того, эритроциты могут восстанавливать S^0 до HS^- , используя восстанавливающие эквиваленты, полученные при окислении глюкозы [16]. Возможно также и ферментативное образование H_2S в красных клетках крови из глутатиона, а также при окислительном стрессе. Установлено, что при некоторых патологических процессах происходит изменение концентрации сероводорода в межклеточном пространстве, в периферической крови, а также в самих эритроцитах. Нельзя исключить, что в условиях повышенной или пониженной продукции H_2S изменяется функционирование как самих $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов, так и внутриклеточных сигнальных систем, участвующих в их регуляции. В связи с вышеизло-

женным представляется актуальным изучение роли сульфида водорода в регуляции $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов мембраны эритроцитов.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния донора сероводорода NaHS на изменение мембранного потенциала эритроцитов, вызванного активацией Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов в присутствии кальциевого ионофора либо искусственной электронно-донорной системы аскорбат – феназинметосульфат.

Материал и методы

В работе использовалась венозная кровь 25 здоровых добровольцев в возрасте 20–27 лет. Кровь забиралась из локтевой вены утром натощак в пробирки с гепарином (25 ед/мл крови).

Процедура получения упакованных эритроцитов: после центрифугирования (1000 g, 5 мин, 4 °С) плазму и клетки белой крови удаляли, а эритроциты дважды промывали тремя частями изотонического раствора NaCl (150 мМ), содержащего 5 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7,4) при тех же условиях центрифугирования. Последний раз осадок эритроцитов промывали средой, содержащей 150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 10 мМ глюкозы, при тех же условиях центрифугирования. После этого упакованные эритроциты переносили на лед и хранили не более 12 ч.

Для регистрации изменений мембранного потенциала эритроцитов в присутствии Ca^{2+} ионофора (A23187) или искусственной электронно-донорной системы аскорбат – ФМС использовался метод [8], основанный на том, что при наличии протонифора (карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон) распределение протонов зависит от мембранного потенциала E_m . $E_m = RT/F (\text{pH}_i - \text{pH}_o)$, где pH_i и pH_o – значения рН цитоплазмы и среды инкубации соответственно. При низкой буферной емкости среды инкубации (в наших условиях она примерно в 100 раз меньше буферной емкости цитоплазмы) изменениями pH_i можно было пренебречь, а его квазистационарный уровень определялся при гемолизе клеток в присутствии детергента.

Эксперименты проводились по следующему плану. Для получения A23187-зависимого ГО к 4,75 мл среды инкубации (150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 10 мМ глюкозы), добавляли 0,25 мл упакованных эритроцитов. Через 5 мин инкубации при 37 °С и перемешивании добавляли 20 мкМ протонифора Cl-CCP, еще через 2 мин добавляли 0,5 мкМ Ca^{2+} -ионофора A23187.

Для получения редокс-зависимого ГО к 4,75 мл среды инкубации того же состава, но содержащей 10 мМ аскорбата натрия добавляли 0,25 мл упакованных эритроцитов. Через 5 мин инкубации при 37 °С и перемешивании добавляли 20 мкМ протонофора Cl-ССР, через 2 мин добавляли 0,1 мМ ФМС.

Для исследования влияния сероводорода на амплитуду A23187-или редокс-зависимого гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов в среду инкубации добавляли донор сероводорода гидросульфид натрия в различных концентрациях (указаны в соответствующих сериях экспериментов). В ряде случаев среда инкубации содержала блокатор Na⁺, K⁺, 2Cl⁻-котранспорта (NKCC) – 5 мкМ буметанида.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы SPSS Statistics 17.0.1 for Windows. Достоверность различий определяли непараметрическими критериями: U-критерий Манна – Уитни (U test Mann – Whitney) для независимых и T-критерий Вилкоксона (Wilcoxon Signed Ranks Test) для зависимых выборок. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1–Q3).

Результаты и их обсуждение

Стимуляция K⁺(Ca²⁺)-каналов эритроцитов в условиях эксперимента может осуществляться в присутствии либо Ca²⁺-ионофора A23187, либо экзогенных доноров электронов (например, системы аскорбат – феназинметосульфат) [2]. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺ благодаря кальциевому ионофору A23187, как и добавление электронно-донорной системы аскорбат – ФМС приводит к сходным изменениям мембранного потенциала эритроцитов, что находит свое отражение в формировании так называемого гиперполяризационного ответа [7]. Амплитуда ГО является интегральной характеристикой, отражающей активность K⁺(Ca²⁺)-каналов эритроцитов.

В первой серии экспериментов гиперполяризационный ответ мембраны эритроцитов получали благодаря увеличению внутриклеточной концентрации ионов кальция с помощью Ca²⁺-ионофора A23187. В этом случае индуцированный A23187 входящий поток ионов Ca²⁺ приводил к открыванию K⁺(Ca²⁺)-каналов и выходу ионов калия. Последнее обеспечивало гиперполяризацию мембраны клеток. Амплитуда A23187-зависимого ГО составила 22,04 (20,88–22,62) мВ (n = 25) (табл. 1).

Таблица 1

Влияние донора сероводорода на амплитуду A23187-зависимого гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов в присутствии ингибитора NKCC, Me (Q₁–Q₃)

Концентрация NaHS, мМ	Значение амплитуды A23187-зависимого ГО, мВ	
	В отсутствии буметанида	В присутствии буметанида
0	22,04 (20,88–22,62)	25,44 (25,39–25,52)
0,005	26,1 (25,52–26,68)*	27,59 (27,56–7,82)#
0,01	20,3 (19,72–20,88)*	27,31 (27,25–27,42)#
0,1	8,7 (8,12–8,95)*	17,42 (17,40–17,56)#
0,2	2,9 (2,9–3,77)*	4,52 (4,42–4,64)#

* – значения амплитуды, достоверно отличающиеся от контрольного значения, полученного в отсутствии NaHS и буметанида (n = 25, p < 0,01). # – значения амплитуды, достоверно отличающиеся от значений, полученных в присутствии NaHS, но в отсутствии буметанида (n = 25, p < 0,01)

В качестве донора сероводорода использовался гидросульфид натрия (NaHS), который в водном растворе подвергается гидролизу, образуя ионы Na⁺ и HS⁻. HS⁻, в свою очередь, взаимодействует с H⁺ с формированием H₂S [19]. Показано, что HS⁻ свободно проникают через мембрану эритроцитов [20].

Инкубация эритроцитов с различными концентрациями NaHS привела к изменению Ca²⁺-зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов, что нашло свое отражение в изменении амплитуды ГО. Так, в присутствии 0,005 мМ NaHS амплитуда ГО возрастала и составила 26,1 (25,52–26,68) мВ (n = 25, p < 0,001). Внесение более

высоких концентраций NaHS (0,01–0,2 мМ) приводило к достоверному снижению амплитуды ГО (см. табл. 1). При концентрациях NaHS, превышающих 0,2 мМ, получить ГО эритроцитов не удалось. Разнонаправленный эффект сероводорода, зависящий от концентрации, ранее был продемонстрирован в работе [21]. Сероводород в концентрациях до 100 мкМ увеличивал механическое напряжение изолированных сегментов аорты крысы, а при повышении концентрации вызывал расслабление последних. Таким образом, нам также удалось получить разнонаправленное изменение амплитуды Ca²⁺-зависимого ГО при низкой (0,005 мМ) и более высоких

(выше 0,01 мМ) концентрациях донора сероводорода.

Другим способом активации K⁺(Ca²⁺)-каналов является внесение в среду инкубации эритроцитов искусственной электронно-донорной системы аскорбат – ФМС. В следующей серии экспериментов мы изучали влияние сероводорода на амплитуду редокс-зависимого ГО. В отсутствие донора сероводорода исследуемый параметр составил 49,88 (49,60–50,75) мВ (*n* = 25). Известно, что система аскорбат – ФМС, являясь искусственной системой переноса электронов, индуцирует Ca²⁺-зависимую калиевую проницаемость мембраны за счет увеличения сродства K⁺(Ca²⁺)-каналов к Ca²⁺ [2]. Следствием этого является развитие гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов. Добавление в среду инкубации эритро-

цитов 0,005 мМ NaHS привело к достоверному снижению амплитуды редокс-зависимого ГО, в то время как амплитуда A23187-зависимого ГО в этих условиях увеличивалась. Дальнейшее увеличение концентрации NaHS в среде инкубации привело к снижению исследуемого параметра. Кроме того, оказалось, что снижение амплитуды редокс-зависимого ГО в присутствии NaHS менее выражено по сравнению с A23187-зависимым ГО. Так, в присутствии 0,1 мМ NaHS амплитуда редокс-зависимого ГО снижается в среднем на 10%, а A23187-зависимого – на 60%. Практически полного подавления редокс-зависимого ГО удалось достичь при инкубации эритроцитов в присутствии 1,6 мМ NaHS, тогда как A23187-зависимый ГО практически полностью подавлялся в присутствии 0,2 мМ NaHS (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Влияние донора сероводорода на амплитуду редокс-зависимого гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов в присутствии ингибитора НКСС, <i>Me</i> (Q_1-Q_3)		
Концентрация NaHS, мМ	Значение амплитуды редокс-зависимого ГО, мВ	
	В отсутствие буметанида	В присутствии буметанида
0	49,9 (49,6–50,7)	46,40 (46,30–46,50)
0,005	45,30 (45,25–45,33)*	45,24 (45,22–45,28)#
0,1	44,80 (43,78–45,24)*	37,34 (37,12–38,40) #
0,15	44,15 (44,08–44,52)*	32,50 (32,48–32,84) #
0,3	34,80 (34,68–35,10)*	27,84 (27,56–28,07) #
0,8	15,08 (14,21–15,37)*	-
1,6	4,64 (3,48–4,64)*	-

* – значения амплитуды, достоверно отличающиеся от контрольного значения, полученного в отсутствие NaHS и буметанида (*n* = 25, *p* < 0,01).# – значения амплитуды, достоверно отличающиеся от значения, полученного в присутствии NaHS, но в отсутствие буметанида (*n* = 25, *p* < 0,01).

Таким образом, оказалось, что зависимость амплитуды ГО от концентрации NaHS определяется способом стимуляции Ca²⁺-зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов. Причину следует искать в механизмах активации K⁺(Ca²⁺)-каналов. Так, в работе [18] было показано, что Ca²⁺ играет определенную роль в запуске калиевой проводимости в условиях искусственной электронно-донорной системы аскорбат – ФМС. Однако возможны и другие пути регуляции калиевой проницаемости мембраны эритроцитов, не связанные с ионами кальция. Система аскорбат – ФМС приводит к образованию редокс-агентов, которые, возможно, оказывают свое влияние на Ca²⁺-зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов опосредованно через -SH-группы. Окисление и восстановление -SH-групп играет определенную роль в редокс-зависимой калиевой проводимости мембраны эритроцитов человека. Возможно, что сульфгидрильные группы белка калиевого канала являются конечным

или промежуточным акцептором в электронном транспорте на мембране эритроцитов. Тогда модуляция -SH-групп может оказаться пусковым конформационным сигналом для запуска работы K⁺(Ca²⁺)-канала.

В работе [18] также было показано, что уменьшение калиевого градиента на мембране эритроцитов, вследствие блокирования Na⁺, K⁺-АТФазы вызывает снижение амплитуды как Ca²⁺-, так и редокс-зависимого ГО мембраны эритроцитов. Известно, что в поддержании ионных градиентов на мембране эритроцитов, кроме Na⁺, K⁺-АТФазы, принимают участие и другие ионотранспортирующие системы, в частности НКСС. С другой стороны, имеются сведения, что активность этого обменника модулируется сероводородом [22].

В связи с этим нами изучено действие ингибитора НКСС буметанида (5 мкМ) на амплитуду A23187- и редокс-зависимого ГО мембраны эритроцитов в присутствии NaHS (см. табл. 1,

2). Оказалось, что влияние донора сероводорода на амплитуду ГО в присутствии блокатора НКСС буметанида также зависело от способа стимуляции канала. Так, амплитуда A23187-зависимого ГО при совместном действии сероводорода (0,005–0,3 мМ NaHS) и буметанида (5 мкМ) оказалась достоверно выше по сравнению с параметрами, полученными в отсутствие блокатора. В то же время в подобных условиях амплитуда редокс-стимулированного ГО эритроцитов, напротив, существенно снижалась по сравнению со значениями в отсутствие буметанида (см. табл 2).

Заключение

Таким образом, в проведенном исследовании установлено, что сероводород оказывает модулирующее действие на $K(Ca^{2+})$ -каналы мембраны эритроцитов. Эффект H_2S зависел от способа активации исследуемых каналов. A23187-зависимый ГО оказался более чувствителен к H_2S по сравнению с редокс-индуцированной гиперполяризацией мембраны эритроцитов: для снижения амплитуды ГО в первом случае требовались существенно более малые концентрации донора NaHS, чем во втором случае. Кроме того, обнаружен разнонаправленный ответ в присутствии 0,005 мМ NaHS: амплитуда A23187-стимулированного ГО увеличивалась, а редокс-зависимого ГО снижалась. Разнонаправленным оказалось и влияние NaHS на амплитуду ответа в присутствии блокатора НКСС: A23187-зависимая гиперполяризация увеличивалась, а редокс-зависимая, напротив, снижалась.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке РФФИ (соглашение № 16-34-00419 от 27.01.2016 г.).

Литература

- Gardos G. Effect of ethylenediaminetetraacetate on permeability of human erythrocytes // *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 1958. V. 14. P. 1–5.
- Lew V.L. On the ATP dependence of the Ca^{2+} -induced increase in K⁺-permeability observed in human red cells // *Biochim. et biophys. acta.* 1971. V. 233. P. 827–830.
- Jensen B.S., Strobaek D., Olesen S.P., Christophersen P. The Ca^{2+} -activated K⁺-channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? // *Curr. Drug. Targets.* 2001 Dec. V. 2, № 4. P. 401–422.
- Lang, F., Lang K.S., Lang P.A., Huber S.M., Wieder T. Mechanisms and significance of eryptosis // *Antioxid Redox Signal.* 2006. V. 8, № 8. P. 1183–1192.
- Begenisich T., Nakamoto T., Ovitt C.E., Nehrke K., Brugnara C, Alper S.L., Melvin J.E. Physiological roles of the intermediate conductance, Ca^{2+} -activated potassium channel Kcnn4 // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279, № 46. P. 47681–47687.
- Петрова И.В., Трубачева О.А., Гусакова С.В. Роль оксида азота в регуляции Ca^{2+} -зависимой K^{+} -проницаемости мембраны эритроцитов // *Вестник Томского государственного университета.* 2011. № 346. С. 165–168.
- Dodson R.A., Hinds T.R., Vincenzi F.F. Effects of calcium and A23187 on deformability and volume of human red blood cells. // *Blood Cells.* 1987. V. 3, № 12. P. 555–564.
- Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И., Баскаков М.Б., Медведев М.А. Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca^{2+} -индуцированных изменений мембранного потенциала // *Биологические мембраны.* 1992. Т. 9, № 9. С. 885–903.
- Петрова И.В., Колосова М.В., Соколова И.Б., Новицкий В.В., Баскаков М.Б., Медведев М.А. Роль внутриклеточных сигнальных систем в регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1997. Т. 123, № 6. С. 653–655.
- Del Carlo B., Pellegrini M., Pellegrino M. Modulation of Ca^{2+} -activated K⁺ channels of human erythrocytes by endogenous protein kinase C // *Biochim Biophys Acta.* 2003. V. 1612, № 1. P. 107–116.
- Кремено С.В., Петрова И.В., Ситожевский А.В., Прокопьева В.Д., Коваленко Н.С., Новицкий В.В. Изучение объем-зависимой регуляции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов в норме и у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2004. Т. 137, № 1. С. 24–26.
- Alvarez J., Garcia-Sancho J., Herreros B. Effect of electron donors on Ca^{2+} -dependent K^{+} -transport in one-step inside-out vesicles from human erythrocyte membrane // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 771. P. 23–27.
- Kennett E.C., Kuchell P.W. Redox reactions and electron transfer across the red cell membrane // *IUBMB Life.* 2003. V. 55, № 7. P. 375–385.
- Wang R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? // *FASEB J.* 2002. V.16, № 13. P. 1792–1798.
- Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress // *Am J. Physiol Cell Physiol.* 2008. V. 295, № 4. P. C849–C868.
- Benavides G.A. et al. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007. V. 104, № 46. P. 17977–17982.
- Гюльханджян А.В., Геокчакян Г.М. Ca^{2+} -зависимый выход K^{+} из эритроцитов, индуцированный окисли-

- тельными процессами. // *Биофизика*. 1991. Т. 36, № 1. С. 169–171.
18. Ситожевский А.В., Петрова И.В., Кремено С.В., Коваленко Н.В., Карпов Р.С. Изучение природы гиперполяризационного ответа эритроцитов, индуцированного системой аскорбат – феназинметосульфат // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2006. Т. 92, № 4. С. 461–470.
19. Abe K., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator // *J. Neurosci.* 1996. V. 16, № 3. P. 1066–1071.
20. Jennings M.L. Transport of H₂S and HS⁻ across the human red blood cell membrane: rapid diffusion and AE1-mediated Cl⁻/HS⁻-exchange // *Am.J. Physiol Cell Physiol.* 2013. V. 305, № 9. P. C941–C950. DOI 10.1152/ajpcell.00178.2013.
21. Баскаков М.Б., Гусакова С.В., Желудева А.С., Смаглий Л.В., Ковалев И.В., Вторушина Т.А., Носов Д.С., Еременко К.В., Медведев М.А., Орлов С.Н. Влияние сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы // *Бюллетень сибирской медицины*. 2010. Т. 9, № 6. С. 12–17.
22. Смаглий Л.В., Гусакова С.В., Бирулина Ю.Г., Ковалев И.В., Орлов С.Н. Роль сероводорода в объем-зависимых механизмах регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток сосудов // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2015. Т. 101, № 4. С. 441–450.

Поступила в редакцию 14.03.2016 г.

Утверждена к печати 15.05.2016 г.

Петрова Ирина Викторовна (✉) – д-р биол. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Розенбаум Юлия Андреевна – студентка 6-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

Бирулина Юлия Георгиевна – ассистент кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Ковалев Игорь Викторович – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Гусакова Светлана Валерьевна – д-р мед. наук, заведующий кафедрой биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

✉ Петрова Ирина Викторовна, e-mail: ivpetrova57@yandex.ru

УДК 612.111:577.352.4:546.221.1

DOI 10.20538/1682-0363-2016-3-79–86

For citation: Petrova I.V., Rosenbaum Yu. A., Birulina Yu.G. et al. Influence hydrogen sulfide on Ca²⁺-dependent potassium permeability of the membrane of human erythrocytes. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15(3): 79–86

Influence hydrogen sulfide on Ca²⁺-dependent potassium permeability of the membrane of human erythrocytes

Petrova I.V., Rosenbaum Yu. A., Birulina Yu.G., Kovalev I.V. Guskova S.V.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation
2 Moscow Trakt, Tomsk, 634050.

ABSTRACT

The purpose of the research was to study the influence of hydrogen sulfide donor NaHS on red blood cells membrane potential changes caused by the activation of Ca²⁺ dependent K⁺ channels in the presence of calcium ionophore or artificial electron donor system ascorbate phenazine methosulfate.

Materials and methods. We used the packed erythrocytes obtained from venous blood of 25 healthy volunteers at the age of 20-27 years. Registration of the membrane potential of erythrocytes in the presence of Ca²⁺ ionophore (A23187) or artificial electron donor system ascorbate – FMS was performed with potentiometric method based on the fact that in the presence of the protonophore distribution of H⁺ depends on the membrane potential Em like as Em = RT/F (pH_i – pH₀). Here pH_i and pH₀ are pH of the incubation medium and cytoplasm, respectively. An amplitude of hyperpolarizing response (HR) was calculated as an integral characteristic of Ca²⁺-dependent permeability for K⁺.

Results. The addition of NaHS at concentrations from 0.2 mM to 0.005 mM into the cells incubation medium caused a change in the amplitude of hyperpolarizing response of erythrocyte membranes induced by both methods. In the presence of 0.005 mM NaHS the amplitude of A23187-dependent HR increased significantly, whereas the amplitude of the redox-dependent HR decreased. Suppression of A23187-dependent HR in the presence of higher concentrations of NaHS was more pronounced than the suppression of the amplitude of redox-dependent response. The amplitude of A23187-dependent HR increased under the joint action of hydrogen sulfide and the blocker of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻-cotransport (NKCC) bumetanide, and the amplitude of redox-dependent HR decreased in comparison with the parameters obtained in the absence of a blocker.

Conclusion. It is found that hydrogen sulfide exerts a modulatory effect on K (Ca²⁺) - channels of erythrocyte membrane. The effect of H₂S depends on the method of activation of the studied channels. A23187-dependent HR was more sensitive to H₂S in comparison to redox-induced HR of erythrocyte membrane. The effect of NaHS on the amplitude of the HR in the presence of NKCC blocker bumetanide also depended on the method of stimulation of channels.

Keywords: hydrogen sulfide, erythrocytes, Ca²⁺ -dependent potassium channels.

References

- Gardos G. Effect of ethylenediaminetetraacetate on permeability of human erythrocytes // *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 1958. V. 14. P. 1–5.
- Lew V.L. On the ATP dependence of the Ca²⁺- induced increase in K - permeability observed in human red cells // *Biochim. et biophys. acta.* 1971. V. 233. P. 827–830.
- Jensen B.S., Strobaek D., Olesen S.P., Christophersen P. The Ca²⁺-activated K⁺channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? // *Curr. Drug. Targets.* 2001 Dec. V. 2, № 4. P. 401–422.
- Lang, F., Lang K.S., Lang P.A., Huber S.M., Wieder T. Mechanisms and significance of eryptosis // *Antioxid Redox Signal.* 2006. V. 8, no. 8. P. 1183–1192.
- Begenisich T., Nakamoto T., Ovitt C.E., Nehrke K., Brugnara C, Alper S.L., Melvin J.E. Physiological roles of the intermediate conductance, Ca²⁺-activated potassium channel Kcnn4 // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279, no. 46. P. 47681–47687.
- Petrova I.V., Trubacheva O.A., Gusakova S.V. Rol oksida azota v regulyatsii Sa2 -zavisimoy K -prontsaemosti membranyi eritrotsitov [Role of nitric oxide regulation of Ca²⁺-dependent K⁺ permeability erythrocyte membranes] // *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2011. no. 346, S. 165–168 (in Russian).
- Dodson R.A., Hinds T.R., Vincenzi F.F. Effects of calcium and A23187 on deformability and volume of human red blood cells. *Blood Cells.* 1987. V. 3, no. 12. P. 555–564.
- Orlov S.N., Petrova I.V., Pokudin N.I., Baskakov M.B., Medvedev M.A. Sa2 -aktiviruemye kalievyye kanaly eritrotsitov, issledovannyye metodom registratsii Ka2 -indutsirovannykh izmeneniy membrannogo potentsiala [Ca²⁺-activated potassium channel of erythrocytes investigated by recording Ca²⁺-induced changes in membrane potential]. *Biologicheskie membrany: Zhurnal membrannoy i kletochnoy biologii*, 1992, vol. 9, no. 9, P. 885–903. (in Russian).
- Petrova I.V., Kolosova M.V., Sokolova I.B., Novitskiy V.V., Baskakov M.B., Medvedev M.A. Rol vnutrikletochnykh signalnykh sistem v regulyatsii Sa2 -aktiviruemykh kalievyykh kanalov eritrotsitov [The role of intracellular signaling systems in the regulation of Ca²⁺-activated potassium channel of erythrocytes]. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*, 1997, vol. 123, no. 6. P. 653–655. (in Russian).
- Del Carlo B., Pellegrini M., Pellegrino M. Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels of human erythrocytes by endogenous protein kinase C // *Biochim Biophys Acta.* 2003. V. 1612, № 1. P.107–116.
- Kremeno S.V., Petrova I.V., Sitozhevskiy A.V., Prokopenko V.D., Kovalenko N.S., Novitskiy V.V. Izuchenie ob'em - zavisimoy regulyatsii Sa2 - aktiviruemykh kalievyykh kanalov eritrotsitov v norme i u bolnykh saharnym diabetom 2 tipa v sochetanii s arterialnoy gipertenziey. [Volume-dependent regulation of Ca²⁺-activated potassium channels in erythrocytes from healthy donors and patients with type II diabetes mellitus aggravated by arterial hypertension] *Bull Exp Biol Med*, 2004, vol. 137, no. 1. P. 24–26 (in Russian).
- Alvarez J., Garcia-Sancho J., Herreros B. Effect of electron donors on Ca²⁺- dependent K⁺- transport in one - step inside - out vesicles from human erythrocyte membrane // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 771. P. 23–27.
- Kennett E.C., Kuchel P.W. Redox reactions and electron transfer across the red cell membrane // *IUBMB Life.* 2003. V. 55, № 7. P. 375–385.
- Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? // *FASEB J.* 2002. V. 16, № 13. P. 1792–1798.
- Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress // *Am J. Physiol Cell Physiol.* 2008. V. 295, no. 4. P. C849–C868.
- Benavides G.A. et al. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007. V. 104, № 46. P. 17977–17982.
- Gyulhandanyan A.V., Geokchakyan G.M. Sa2-zavisimyy vyihod K iz eritrotsitov, indutsirovannyiy okislitelnyimi protsessami [Ca²⁺-dependent K⁺ output of the red blood

- cells induced by oxidative processes]. *Biofizika*, 1991, Т. 36, no. 1. P. 169–171 (in Russian).
18. Sitozhevskiy A.V., Petrova I.V., Kremeno S.V., Kovalenko N.V., Karpov R.S. Izuchenie prirodny giperpolarizatsionnogo otveta eritrotsitov, indutsirovannogo sistemoy askorbat – fenazinmetosulfat [Phenazine methosulfate system-induced membrane hyperpolarization in the human erythrocytes]. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*, 2006, vol. 92, no. 4. P. 461–470 (in Russian).
19. Abe K., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator // *J. Neurosci.* 1996. V. 16, no. 3. P. 1066–1071.
20. Jennings M.L. Transport of H₂S and HS⁻ across the human red blood cell membrane: rapid diffusion and AE1-mediated Cl⁻/HS⁻ exchange // *Am.J. Physiol Cell Physiol.* 2013. V. 305, no. 9. P. C941–C950. DOI 10.1152/ajpcell.00178.2013.
21. Baskakov M.B., Gusakova S.V., Zheludeva A.S., Smagly L.V., Kovalev I.V., Vtorushina T.A., Nosov d.S., Erenenko K.V., Medvedev M.A., Orlov S.N. Vliyanie serovodoroda na sokratitelnuyu aktivnost gladkomyishechnykh kletok aortyi kryisyi [Effect of hydrogen sulfide on the contractile activity of smooth muscle cells from the rat aorta] // *Byulleten sibirskoy meditsiny*, 2010, vol. 9, no. 6. P. 12–17 (in Russian).
22. Smagly L.V., Gusakova S.V., Birulina Yu.G., Kovalev I.V., Orlov S.N. Rol serovodoroda v ob'em-zavisimyykh mekhanizmakh regulyatsii sokratitelnoy aktivnosti gladkomyishechnykh kletok sosudov [The role of hydrogen sulfide in the volume-dependent mechanisms of regulation of contractile activity of vascular smooth muscle cells] // *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*, 2015. T. 101, no. 4. P. 441–450. (in Russian).

Petrova Irina V. (✉), professor of the Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Rosenbaum Yuliya A., student of 6th year Medical and Biological Faculty, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Birulina Yuliya G., assistant of the Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Kovalev Igor V., professor of the Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Gusakova Svetlana V., Head of Department Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ **Petrova Irina V.**, e-mail: ivpetrova57@yandex.ru