

# Газовая атака, или Осторожно, газы!

*Баскаков М.Б.<sup>1</sup>, Юсубов М.С.<sup>1,2</sup>*

## Gas attack or gently, the gases!

*Baskakov M.B., Yusubov M.S.*

<sup>1</sup> *Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск*

<sup>2</sup> *Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск*

© Баскаков М.Б., Юсубов М.С.

В статье даются современные представления о газовой коммуникации в гладкомышечных клетках, рассмотрены основные механизмы действия газотрансмиттеров, анализируются различные взгляды на природу эндотелиального релаксирующего и эндотелиального гиперполяризующего факторов. Обсуждаются дискуссионные вопросы механизмов эндотелий-зависимого расслабления гладких мышц сосудов.

**Ключевые слова:** гладкая мышца, внутриклеточная сигнализация, газотрансмиттеры, эндотелиальный расслабляющий фактор, эндотелиальный гиперполяризующий фактор, вазорелаксация.

The article contains the current understanding of gas communication in smooth muscle cells, the basic mechanisms of action of gaseous transmitters, analyzes the different views on the nature of the endothelial relaxing and endothelial hyperpolarizing factors. We discuss the controversial issues of the mechanisms of endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle.

**Key words:** smooth muscle, intracellular signaling, gaseous transmitters, endothelial relaxing factor, endothelial hyperpolarizing factor, vascular relaxation.

УДК 576.32/36:544.277

Данные размышления навеяны тремя знаменательными событиями в истории молекулярной физиологии и биофизики клетки. Первое произошло в 1883 г. и связано с эпохальной статьей Сиднея Рингера в Лондонском физиологическом журнале, открывшей кальциевую эру в клеточной физиологии и положившей начало системе знаний, которую современники воспринимают как учение о внутриклеточной сигнализации. Работам в этой области молекулярной физиологии авторы посвятили не одно десятилетие. Второе воистину революционное событие — публикация Fatt и Katz (1953) о кальциевой природе потенциалов действия в мышечных клетках ракообразных. Это сообщение произвело настоящий фурор в научных кругах, настолько стройна, незыблемо доказательна была теория Ходжкина—Хаксли, основанная на богатейшей экспериментальной базе, красива и работоспособна предложенная математическая модель Ходжкина о натриевой природе потенциалов действия. Третье событие, современниками которого нам посчастливилось быть и которое можно проиллюстрировать названиями только трех из множе-

ства статей, выражающих удивление, восторг и восхищение глубинами непознанного и способностью природы поражать воображение научного сообщества: IT'S A GAS MFN! Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential; Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter?

Внутриклеточная передача сигналов инициируется, как правило, взаимодействием нейромедиаторов или гормонов (первичных посредников) с мембранными рецепторами, локализованными в плазматической мембране. Лиганд-рецепторное взаимодействие индуцирует появление вторичных посредников, которые прямо или с помощью дополнительных молекулярных событий изменяют функциональное состояние клеток. На наш взгляд, доктор Moncada (1987) сделал два открытия, причем менее значимое из них — идентификация NO как эндотелиального релаксирующего фактора — было отмечено Нобелевской премией. В то время как главной его заслугой было открытие принципиально отличного способа трансляции сигналов в

клетках, не связанного с лиганд-рецепторным (мембранным) взаимодействием.

Развитие этого направления с неизбежностью привело к признанию существования рецепторнезависимых сигнальных механизмов и заставило пересмотреть ставшую традиционной (классической) доктрину о внутриклеточной передаче сигналов. Последующее за этим возрождение монооксида углерода как другого эндогенного сигнального газа было более спокойно воспринято почти всеми исследователями молекулярно-физиологических процессов в клетке и межклеточных взаимодействий. Отличия NO и CO от классических нейротрансмиттеров и гормонов, несмотря на признание ряда их общих черт, по целому ряду признаков дают основания отнести эти газовые посредники к группе газотрансмиттеров.

Оксиды азота и углерода были первыми газотрансмиттерами. Однако очередной бум — газовый — только набирал обороты. Основываясь на общих закономерностях оперирования CO, NO и отчасти супероксиданиона в моделях с перекисью водорода, ученый мир признал сероводород H<sub>2</sub>S третьим газотрансмиттером. И время потекло вспять. Первый и наиболее значимый эффект сероводорода — сосудорасслабляющий — был описан, признан и феноменологически изучен. Сероводород соответствовал всем принципиальным качествам эндотелиального расслабляющего фактора (EDRF) [20]. Он избирательно содержится в эндотелиоцитах «нормальных» сосудов. У животных, нокаутированных по cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE), сокращающее сосуд влияние а-агониста фенилэфрина и прямое расслабляющее действие доноров оксида азота не отличались от интактных животных. В то время как H<sub>2</sub>S много более эффективно расслаблял CSE-нокаутированную брыжеечную артерию, чем этот же сосуд интактных животных, что указывает на гиперчувствительность первого, связанную со снижением продукции эндогенного сероводорода. Напротив, расслабляющее действие метахолина было снижено на 80% в брыжеечной артерии гомозиготных CSE-нокаутированных крыс и на 50% у гетерозиготных. Хорошо известно, что метахолиновая релаксация отражает активность EDRF. Следовательно, эти данные указывают на то, что основная EDRF-активность может быть связана с H<sub>2</sub>S. M<sub>1</sub>-холинергическая активация кровеносных сосудов активирует eNOS и продукцию NO. Сходно с этим метахолин трехкратно повышает уровень H<sub>2</sub>S, которое

устраняется истощением CSE эндотелиоцитов с использованием РНК-интерференции (depletion of CSE utilizing RNA interference).

Какова же роль NO, если основная EDRF-активность связана с H<sub>2</sub>S? Хорошо подтвержденными считаются данные о том, что NO является EDRF в большинстве исследованных сосудистых регионов, но во многих сосудах EDRF-активность лишь частично ослабляется ингибиторами NOS или у eNOS-нокаутированных животных [5]. Эндотелийзависимая релаксация проявляет выраженный NO-зависимый характер в крупных сосудах, таких как аорта, в сосудах сопротивления преобладает прямая регуляция давления крови, и роль оксида азота менее очевидна [3]. Определение относительной роли NO, CO и H<sub>2</sub>S в реализации физиологического эндотелийопосредованного расслабления требует параллельного сравнения гемоксигеназы HO<sub>2</sub>-, eNOS и CSE-нокаутированных мышей и других видов животных, а также проведения исследований с препаратами из различных сосудистых областей.

Сакраментальным вопросом молекулярной физиологии сероводорода является его механизм действия. Хорошо установлено, в том числе и работами, выполненными в нашей лаборатории, что действие NO обусловлено стимуляцией растворимой гуанилатциклазы (pGC). CO также повышает уровень циклического гуанинмонофосфата (цГМФ). Вместе с тем доноры оксида азота (Гусакова) и эндогенный CO оказывают расслабляющее действие и через цГМФ-независимый (e) механизм (ы) [14]. Имеются основания полагать, что CO действует через кальцийактивируемые калиевые каналы большой проводимости (BKCa). В частности, эти же авторы показали, что блокаторы BKCa ингибируют CO-индуцированное расслабление сосудов. Более того, ингибиторы гемоксигеназы (HO) подавляют активность BKCa в некоторых сосудистых регионах [10, 11, 17]. Характерно, что действие CO на BKCa обусловлено связыванием с гемом, подобно тому как NO связывается с гемом pGC. Допускается, что а-СЕ BKCa содержит гемсвязывающую полость, сайт (карман). Связывание с каналом гема угнетает оперирование BKCa, а оккупация гема, ассоциированного с каналом, оксидом углерода освобождает активность BKCa [7].

В механизмы расслабляющего действия EDRF вовлечена гиперполяризация мембраны гладкомышечных клеток (ГМК). Этот феномен не выявляется при

активации рГЦ. Соответственно, для полного объяснения эффектов EDRF следовало допустить существование эндотелиального гиперполяризующего фактора (EDHF). Кандидатов на эту роль нашлось немало. Это простаглицлин, получаемый из арахидоновой кислоты (АА) циклооксигеназой, эпоксиэйкозотреновая кислота, генерируемая цитохромом P450 из АА, перекись водорода, ионы калия, натрийуретический пептид С-типа, электрическое сопряжение через миоэндотелиальные (щелевые) контакты, опосредованные коннексонами и собственно NO [2, 12]. К сожалению, ни одно из этих предположений не получило прямых и убедительных доказательств, в том числе с использованием животных-мутантов.

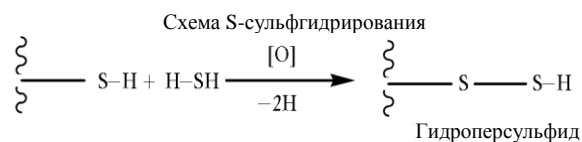
В брыжеечных артериях и аорте мышей ингибирование NOS и циклооксигеназы снижает холинергическую EDRF-активность только на 20% [13]. Остающиеся 80% холинергической релаксации связаны с выраженной гиперполяризацией мембраны ГМК, при которой МПП приближается к калиевому равновесному потенциалу. Знаменательно, что эта гиперполяризация полностью устраняется в ГМК сосудов, полученных от CSE-нокаутированных гомозиготных мышей.

Активность EDHF отражает открывание калиевых каналов [2, 12]. В самом деле сосудорасслабляющее действие  $H_2S$  угнеталось блокаторами АТФ-чувствительных калиевых каналов (КАТФ) [4, 18, 19]. Селективный ингибитор КАТФ-каналов глибенкламид уменьшает холинергическую гиперполяризацию ГМК брыжеечной артерии примерно на 70% (Mustafa и соавт., 2006) и не влияет на расслабляющее действие сосудов донаров оксида азота.

Механизм стимуляции сероводородом КАТФ, по-видимому, следующей. КАТФ у С43 содержит девять цистеиновых радикалов, которые тесно прилегают к поверхности клеток и подвержены влиянию окислителей. КАТФ сульфидрируется сероводородом у интактных животных, но сульфидрирование отсутствует у мутантов С43. Следовательно, расслабление при действии сероводорода связано с гиперполяризацией, опосредованной открыванием КАТФ-каналов благодаря их сульфидрированию на С43 [13].

КАТФ физиологически активен при связывании фосфатидилинозитол(4,5)-бифосфата (PIP2) [1, 15]. Связывание последнего устраняется в клетках, лишенных CSE или содержащих неактивный фермент.

Доноры сероводорода достоверно стимулируют связывание PIP2 с КАТФ. Образование PIP2-КАТФ вовлекает сульфидрирование С43, поскольку связывание значительно снижалось в КАТФ-С43-мутантах.



Резюмируя изложенное, можно предполагать, что вазодилатация в физиологических условиях определяется преимущественно эндотелийзависимой гиперполяризацией, и в EDHF-активности главенствующее место занимает  $H_2S$ . И именно ему, гидросульфиду, газу с дурным запахом, но со светлым будущим, отводится роль EDRF/EDHF.

Вместе с тем нельзя, во всяком случае сегодня, радоваться таким, казалось бы, однозначным и убедительным результатам. Во-первых, потому, что жалко и обидно за оксид азота — «молекулу года», донорам которого и собственно газу верят клиницисты и многие экспериментаторы. Во-вторых, лучшее может быть врагом хорошего, и, наконец, однозначность и убедительность изложенных данных может еще обсуждаться. При исследовании роли ионов калия и эндотелия в расслабляющем коронарные сосуды крысы действии  $H_2S$  показал, что расслабление угнеталось блокатором потенциалзависимых калиевых каналов 4-аминопиридином (4-АП) и снижалось в сосудах, предсокращенных гиперкалиевыми растворами, но не изменялось в присутствии глибенкламида, ибериотоксина, L-NAME, индометацина. Расслабляющее действие  $H_2S$  сопровождалось гиперполяризацией, которая, как и расслабление, ослаблялась 4-АП, но не глибенкламидом. На основании этих данных авторы считают, что в коронарах крысы гидросульфид обуславливает эндотелийнезависимую релаксацию посредством активации 4АП-чувствительных каналов ГМК и гиперполяризацию. По мнению авторов, другие К-каналы, Na/K-насос и EDRF играют незначительную роль. С. Vaner (2010) сообщила об освобождении донорами сероводорода кальция из внутриклеточных депо в эндотелиоцитах человека, а ведь именно освобождаемый в клетке кальций является приоритетным кофактором в оперировании K(Ca)-каналов, и, может быть, при этом, и вероятнее всего, происходила гиперполяризация мембраны этих клеток? И тот же кальций является

активатором eNOS, но не CSE. Тогда стоит вспомнить мнение P.M. Vanhoutte, согласно которому EDHF — это феномен, включающий в себя гиперполяризацию мембраны обоих участников взаимодействия — эндотелиоцитов и ГМК, а изменение мембранного потенциала последних осуществляется в результате оперирования миоэндотелиальных щелевых контактов и (или) тех же ионов калия, выходящих из эндотелиоцитов [6]. Первой фазой их действия может быть гиперполяризация мембраны ГМК вследствие активации Na/K-насоса?

Наконец, донор H<sub>2</sub>S в том же концентрационном диапазоне (10<sup>-4</sup>—10<sup>-3</sup> моль) вызывал подкисление цитоплазмы ГМК, степень которого, как и вазорелаксации, уменьшалась при блокировании Cl/HCO<sub>3</sub>-обменника, и, как считает J. Bian (2009), именно ацидификация цитоплазмы ГМК есть причина расслабления сосудистых сегментов аорты крысы [9, 16]. Но в нашей лаборатории расслабление сегментов аорты наблюдали при действии донора сероводорода (10<sup>-5</sup>—10<sup>-4</sup> моль) в растворе с органическим буфером pH, где Cl/HCO<sub>3</sub>-обменник выключен по определению

И, по-видимому, последнее замечание, заставившее авторов открыть эту дискуссию. При изучении концентрационной зависимости действия донора сероводорода на деэндотелизированные сегменты аорты крысы как модели артериального сосуда мышечного типа было обнаружено констрикторное действие этого газа при концентрациях NaHS 10<sup>-5</sup>—10<sup>-4</sup> моль и расслабляющее влияние сероводорода при повышении его содержания в растворе. Этот факт не описан ни в одной из работ известной своими достижениями в области газовой коммуникации лаборатории доктора Вонга (Wang, 2002—2010), однако подмечен в экспериментах Jia Jia Lim и соавт. [8], но предложенное объяснение этого возбуждающего действия сероводорода не нашло подтверждения в исследованиях авторов настоящей статьи.

Вероятно, истина, как всегда, находится где-то посередине, а именно: все перечисленные механизмы не являются взаимоисключающими, а могут действовать одновременно. Может быть, EDRF/EDHF — это и феномен, и семейство посредников, конечным результатом действия (или взаимодействия друг с другом и ГМК) является расслабление и гиперполяризация этих клеток. Принципиален для дальнейших исследований и дискуссий только порядок слов:

гиперполяризация и расслабление или расслабление и гиперполяризация. Место каждого из кандидатов на роль EDRF/EDHF в «ряду приоритетов» может быть различным в зависимости от вида животных, объекта-сосуда, уровня исходного механического напряжения (тонуса), pO<sub>2</sub>, pH, вида, содержания животных, возраста, пола, овуляторного цикла, способа приготовления препаратов-сосудов, растворов и реактивов и наверняка еще ряда непознанных факторов. Современные знания этого процесса позволяют утверждать, что в конкретных условиях данное (ые) вещество (а) (EDRF/EDHF) или цепь молекулярных событий (или процесс) может приводить к вазорелаксации через гиперполяризацию мембраны ГМК. Если же EDHF идентифицировать с посредником, индуцирующим гиперполяризацию эндотелиоцитов, которая «транслируется» в гиперполяризацию ГМК с последующим расслаблением последних, т.е. своеобразный «междусобойчик» калиевых проводимостей, миоэндотелиальных электрических взаимодействий и рукопожатий Na-насосов, круг непознанного, а вернее, необсужденного и недоговоренного расширяется вплоть до определения самих терминов EDRF и EDHF.

#### Литература

1. *Baukrowitz T., Schulte U., Oliver D. et al.* PIP<sub>2</sub> and PIP as determinants for ATP inhibition of K<sub>ATP</sub> channels // *Science*. 1998. V. 282. P. 1141—1144.
2. *Bellian J., Thuillez C., Joannides R.* Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans // *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2008. V. 22. P. 363—377.
3. *Brandes R.P., Schmitz-Winnenthal F.H., Félétou M. et al.* An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 9747—9752.
4. *Cheng Y., Ndisang J. F., Tang G. et al.* Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004. V. 287. P. 2316—2323.
5. *Félétou M., Vanhoutte P.M.* Endothelium-dependent hyperpolarization: past beliefs and present facts // *Ann. Med.* 2007. V. 39. P. 495—516.
6. *Furchgott R.F., Vanhoutte P.M.* Endothelium-derived relaxing and contracting factors // *FASEB J.* 1989. № 3. P. 2007—2018.
7. *Jaggar J.H., Li A., Parfenova H. et al.* Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels // *Circ. Res.* 2005. V. 97. P. 805—812.
8. *Jia Jia Lim et al.* Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cell // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2008. № 295.

- P. 1261—1270.
9. Jinsong Bian Novel Mechanisms for The Vasorelaxant and Vasoconstrictive Effects of Hydrogen Sulfide // *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2010. Aug. № 27 (4). P. 518—524.
  10. Kaide J.-I., Zhang F., Wei Y. et al. Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 107. P. 1163—1171.
  11. Li A., Xi Q., Umstot E.S. et al. Astrocyte-derived CO is a diffusible messenger that mediates glutamate-induced cerebral arteriolar dilation by activating smooth muscle cell  $K_{Ca}$  channels // *Circ. Res.* 2008. V. 102. P. 234—241.
  12. Luksha L., Agewall S., Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease // *Atherosclerosis*. 2009. V. 202. P. 330—344.
  13. Mustafa A. K., Gadalla M. M., Sen N.  $H_2S$  signals through protein S-sulfhydration // *Sci. Signal*. 2009. V. 2. ra72.
  14. Naik J.S., Walker B.R. Heme oxygenase-mediated vasodilation involves vascular smooth muscle cell hyperpolarization // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003. V. 285. P. H220—H228.
  15. Shyng S.-L., Nichols C.G. Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of  $K_{ATP}$  channels // *Science*. 1998. V. 282. P. 1138—1141.
  16. Shiau Wei Lee Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008. V. 358, № 4. P. 1142—1147.
  17. Zhang F., Kaide J.-I., Wei Y. et al. Carbon monoxide produced by isolated arterioles attenuates pressure-induced vasoconstriction // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001. V. 281. P. H350—H358.
  18. Zhao W., Wang R.  $H_2S$ -induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002. V. 283. P. 474—480.
  19. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. The vasorelaxant effect of  $H_2S$  as novel endogenous gaseous  $K_{ATP}$  channel opener // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 6008—6016.
  20. Yang G., Wu L., Jiang B. et al.  $H_2S$  as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine  $\gamma$ -lyase // *Science*. 2008. V. 322. P. 587—590.

Поступила в редакцию 14.09.2010 г.

Утверждена к печати 28.09.2010 г.

#### Сведения об авторах

М.Б. Баскаков — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

М.С. Юсубов — д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой химии СибГМУ (г. Томск).

#### Для корреспонденции

Баскаков Михаил Борисович, тел. (3822) 42-09-54; e-mail: baskakovmb@mail.ru