

Т. В. Шиманская, Ю. В. Гошовская,
член-корреспондент НАН Украины В. Ф. Сагач

Влияние сероводорода на функциональное состояние и резервные возможности миокарда

В экспериментах на изолированных по методу Лангендорфа сердцах крыс показано, что 15-минутная перфузия изолированного сердца донором сероводорода гидросульфидом натрия в дозе 10^{-6} М приводит к развитию депрессорной реакции миокарда и истощению его функциональных резервов, что сопровождается повышением чувствительности митохондриальных мембран кардиомиоцитов к действию ионов Ca^{2+} . Полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии применяемой дозы сероводорода на сердечную мышцу.

В настоящее время сероводород (H_2S) наряду с оксидом азота и монооксидом углерода относят к представителям газообразных сигнальных соединений, которые легко проникают через мембрану и регулируют ферментативные реакции клетки, оказывая серьезное влияние на функцию всего организма [1, 2]. Установлено, что сероводород синтезируется из L-цистеина с помощью ферментов цистатионин- β -синтазы (ЦБС), проявляющей наибольшую активность в мозге, и цистатионин- γ -лиазы (ЦГЛ), преобладающей на периферии, в частности, в стенках кровеносных сосудов [3] и в сердце [4]. Кроме этого, в сердце H_2S образуется ферментом 3-меркаптопируват сульфуртрансферазой, активной как в цитозоле, так и в митохондриях клетки [5]. Среди физиологических эффектов сероводороду приписывают в первую очередь мощное вазодилаторное влияние [6], данные о влиянии его на сердце достаточно противоречивы: зарегистрированы отрицательный инотропный и хронотропный эффекты, с одной стороны [4, 7], и кардиопротекторное влияние — с другой [8–10].

Целью настоящего исследования было изучение влияния перфузии донора сероводорода NaHS на функциональное состояние, резервные возможности и изменения проницаемости митохондриальных мембран в условиях нагрузок ионами кальция изолированного сердца крыс.

Методика. Эксперименты проводили согласно требованиям Европейской конвенции относительно работы с экспериментальными животными (Страсбург, 1986). На изолированных сердцах крыс линии Вистар массой 300–400 г осуществляли ретроградную перфузию коронарных сосудов при постоянном давлении 75 мм рт. ст., температуре 37°C , аэрации карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2) раствором Кребса–Хензелейта следующего состава, мм: NaCl — 118; KCl — 4,7; MgSO_4 — 1,2; NaHCO_3 — 24; KH_2PO_4 — 1,2; глюкоза — 10; CaCl_2 — 2,5. Давление в полости левого желудочка (развиваемое давление, $P_{\text{лж}}$), его первую производную dP/dt_{max} и dP/dt_{min} , конечно-диастолическое давление (КДД) измеряли с помощью латексного баллончика тензодатчиками 746 (“Мингограф-82”, Elema, Швеция) и регистрировали сигнал с помощью программного обеспечения Global Lab. Величину коронарного потока (КП) определяли по объему оттекающего от сердца перфузионного раствора за 1 мин. Рассчитывали интенсивность сократительной функции (ИСФ) как произведение

развиваемого давления на частоту сердечных сокращений. Напряжение кислорода в притекающем и оттекающем от сердца через легочной ствол растворе измеряли с помощью газоанализатора BMS 3 Mk 2 (Дания). Кислородную стоимость работы сердца вычисляли как отношение потребления кислорода к ИСФ.

Для оценки функциональных резервов сердца проводили дозированную нагрузку объемом путем растягивания баллончика с шагом 34 мкл и строили кривую зависимости изменения конечно-диастолического и развиваемого давления в левом желудочке от изменения его объема.

С целью выявления адаптационных возможностей миокарда и его чувствительности к образованию митохондриальных пор воспроизводили модель кальциевой перегрузки миокарда — последовательно увеличивали концентрацию CaCl_2 в перфузионном растворе с 2,5 до 12,5 мМ. Через 15 мин после повышения дозы Ca^{2+} брали пробы оттекающего от сердца раствора для измерения его оптической плотности и выявления митохондриального фактора. Последний регистрировали спектрофотометрически (СФ-46) в диапазоне длины волны 230–260 нм. Митохондриальный фактор обуславливает характерный пик поглощения при длине волны 245 нм и может служить маркером открытия митохондриальной поры в условиях *in vivo* [11].

Для выяснения влияния сероводорода на функциональное состояние сердца в перфузионный раствор вводили донор H_2S — гидросульфид натрия (NaHS , “Sigma”, 10^{-6} М), который при растворении в воде диссоциирует на ионы Na^+ и HS^- , последний взаимодействует с протоном, образуя растворенный в воде H_2S .

Статистически обработанные данные выражали в виде среднего \pm стандартное отклонение. Достоверность изменений показателей рассчитывали с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Перфузия изолированного сердца крыс в течение 15 мин донором сероводорода NaHS сопровождалась определенным угнетением функционального состояния сердца (табл. 1). Особое внимание обращает на себя замедление процессов расслабления миокарда. Повышение КДД, снижение скорости расслабления миокарда на фоне тенденции к уменьшению КП и частоты сердечных сокращений приводило к достоверному изменению интенсивности сократительной функции, отражающей работу сердца.

Результаты исследования функциональных резервов сердца, которое проводилось посредством дозированного увеличения объема левого желудочка в контрольных условиях

Таблица 1. Влияние перфузии NaHS (10^{-6} М) на показатели функционального состояния сердца

Показатель	Длительность перфузии NaHS , мин			
	0	5	10	15
Давление в левом желудочке, мм рт. ст.	$109 \pm 1,6$	$110 \pm 2,3$	$106 \pm 2,3$	$104 \pm 3,3$
Конечно-диастолическое давление, мм рт. ст.	$-6,4 \pm 0,8$	$-4,8 \pm 0,6$	$-2,4 \pm 0,8$	$-0,6 \pm 1,0^{***}$
dP/dt_{\max} , мм рт. ст./с	2072 ± 42	2088 ± 60	2016 ± 68	1959 ± 63
dP/dt_{\min} , мм рт. ст./с	2129 ± 52	2088 ± 79	1949 ± 90	$1895 \pm 59^{**}$
Коронарный поток, мл/мин	$14,9 \pm 1,4$	$14,2 \pm 1,4$	$13,5 \pm 1,5$	$12,7 \pm 1,3$
Частота сердечных сокращений, уд/мин	$227 \pm 4,1$	$221 \pm 9,3$	$207 \pm 13,8$	$205 \pm 14,5$
Интенсивность сократительной функции, мм рт. ст./мин	24796 ± 333	24282 ± 846	21926 ± 1401	$21194 \pm 1042^{**}$

* $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$.

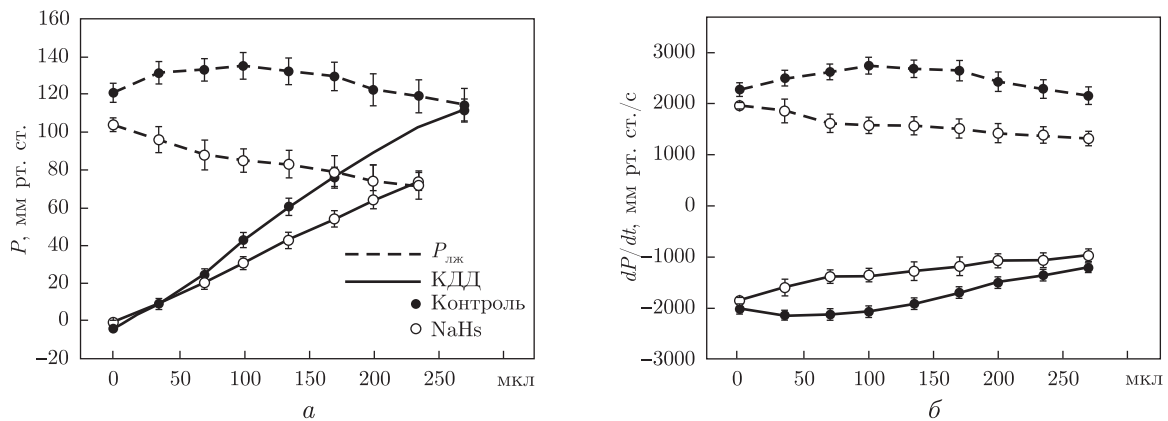


Рис. 1. Влияние донора сероводорода на развитие сократительной реакции сердца в ответ на увеличение объема левого желудочка. *а* — изменение конечно-диастолического (КДД) и развиваемого ($P_{\text{лж}}$) давления; *б* — его первой производной при дополнительном растяжении баллончика в левом желудочке

и на фоне перфузии NaHS, показали, что в последнем случае кривая Франка–Старлинга смещалась вниз и влево (рис. 1). Инотропная стимуляция сердца в ответ на его растяжение полностью отсутствовала, индексы сократительной активности и расслабления миокарда неуклонно снижались. Таким образом, под действием перфузии донора сероводорода в данной концентрации функциональные резервы сердца исчерпываются.

Этот вывод подтверждается результатами экспериментов с моделированием нагрузки ионами кальция. Установлено, что при пошаговом повышении концентрации кальция в перфузионном растворе реакция сердец, предварительно подвергавшихся действию NaHS, существенно отличалась от таковой, зарегистрированной в контрольных экспериментах. Положительная инотропная стимуляция миокарда наблюдалась только при концентрации кальция в перфузионном растворе 5,0 мМ, хотя у контрольных крыс максимальный прирост давления и сократительной активности сердца регистрировали в ответ на перфузию 7,5 мМ CaCl_2 , в последнем случае амплитуда прироста всех показателей кардиодинамики была несопоставимо выше (рис. 2). При последующем увеличении дозы CaCl_2 в перфузионном растворе для сердец, подвергавшихся воздействию NaHS, давление в левом желудочке и сократительная активность миокарда, а также производимая сердцем работа не только не увеличивались, а существенно уменьшались, что свидетельствовало о значительном угнетении функционального состояния сердца и отсутствии у него каких-либо резервов. Таким образом, внесение NaHS в дозе 10^{-6} М в раствор, перфузирующий сердечную мышцу и обеспечивающий прямое воздействие сероводорода на миокард, сопровождалось существенным угнетением работы сердца. Результаты экспериментов с применением больших (10^{-4} М) или меньших (10^{-8} М) доз NaHS дают основание говорить о дозозависимом негативном воздействии сероводорода на сердечную мышцу.

Хорошо известно, что ионы Ca^{2+} являются естественным стимулятором открывания митохондриальных пор в клетке. В наших экспериментах маркером степени проницаемости митохондриальных мембран кардиомиоцитов и образования митохондриальных пор служил митохондриальный фактор, который выделялся в оттекающий от сердца раствор [11]. После предварительного воздействия NaHS митохондриальный фактор был зафиксирован в перфузионном растворе уже при концентрации Ca^{2+} 5 мМ, а в контрольной серии —

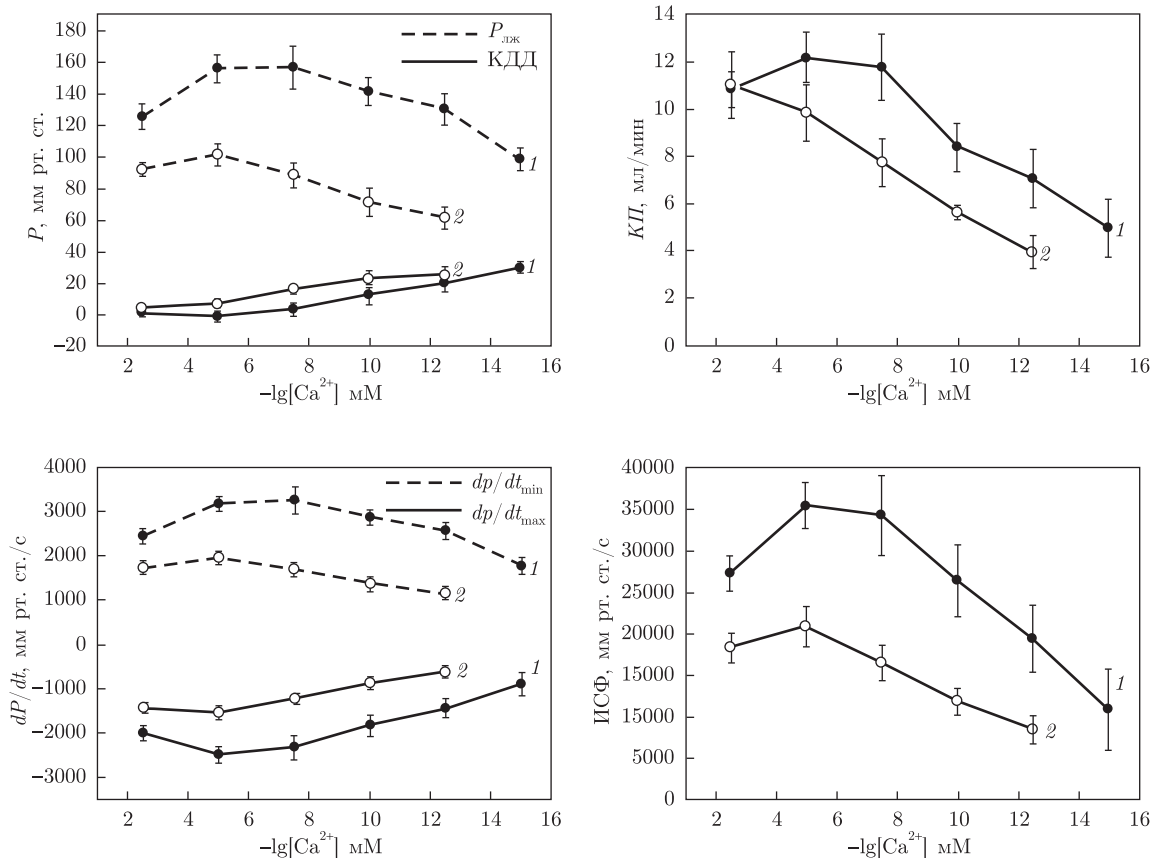


Рис. 2. Изменение показателей функционального состояния изолированного сердца в ответ на увеличение концентрации Ca^{2+} в перфузионном растворе в контрольных условиях (1) и после перфузии NaHS (2)

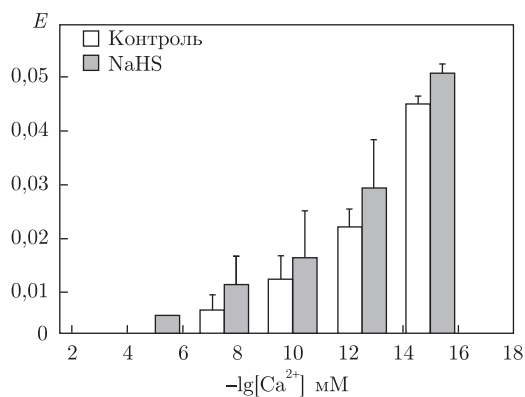


Рис. 3. Влияние нагрузки кальцием на выделение митохондриального фактора в раствор, оттекающий от сердца в контрольных экспериментах и после предварительной перфузии NaHS

от 7,5 мМ (рис. 3). Амплитуда увеличения оптической плотности оттекающего раствора также превышала таковую, зарегистрированную в пробах раствора контрольных сердец, т. е. на фоне перфузии донора сероводорода активация митохондриальных пор в кардиомиоцитах происходила значительно легче. Этот факт свидетельствует о том, что сероводород увеличивает чувствительность сердца к ионам Ca^{2+} .

Таким образом, 15-минутная перфузия изолированного сердца донором сероводорода NaHS приводила к развитию депрессорной реакции миокарда и истощению его функциональных резервов, что сопровождалось повышением чувствительности сердца к действию ионов Ca^{2+} . Полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии применяемой дозы сероводорода на сердечную мышцу.

В настоящее время известно о широком спектре действия сероводорода на сосудистые и миокардиальные клетки. Установлено благотворное воздействие его доноров при асептическом воспалении, геморрагическом шоке, эндотоксемии и бактериальном сепсисе [3]. Отмечены модификация тонуса гладких мышц, индукция апоптоза, влияние на ангиогенез, цитопротекция при ишемии–реперфузии [12]. Одним из механизмов действия сероводорода является изменение конформации и функциональной активности белков за счет присоединения атома серы к тиоловой группе –SH или связывание с макромолекулами типа цитохромоксидазы [13]. Считается, что сероводород оказывает расслабляющее действие на гладкие мышцы кровеносных сосудов посредством активации АТФ-зависимых K^+ -каналов: под влиянием H_2S происходит утечка ионов калия из клетки, что сопровождается гиперполяризацией мембраны гладкомышечных клеток, ингибированием потенциалзависимых Ca -каналов, снижением внутриклеточной концентрации кальция и, как следствие, расслаблением сосудистой стенки [1]. Среди молекулярных механизмов действия сероводорода описаны также регуляция окислительно-восстановительного баланса и взаимодействие с NO [12].

В наших экспериментах 15-минутная перфузия изолированного сердца крыс с добавлением NaHS в дозе 10^{-6} М сопровождалась не только стойким угнетением функции миокарда, но и полным истощением его функциональных резервов, что отражалось на форме кривой Франка–Старлинга. Сходный характер реакции сердца на перфузию различных доз донора сероводорода в экспериментах *in vitro* и *in vivo* был описан В. Geng и соавт. [8]. Существует мнение, что отрицательное инотропное влияние сероводорода на сердце может быть опосредовано как блокадой потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов, так и ингибированием аденилатциклазы [12]. Показано, что вазоконстрикторные эффекты сероводорода реализуются с участием сАМР [14]. При низком содержании эндогенный сероводород работает как сигнальная молекула. Есть сведения, что концентрация его в тканях находится в наномолярных пределах [15]. Использование нами NaHS в дозе 10^{-8} М также приводило к развитию депрессорной реакции сердца. Вероятно, любое превышение физиологической концентрации сероводорода будет сопровождаться дозозависимым угнетением функционального состояния сердечной мышцы. Полученный нами факт серьезного истощения функциональных резервов сердца и увеличения его чувствительности к действию ионов Ca^{2+} после введения донора сероводорода свидетельствует об активном вовлечении ионов кальция в механизм реализации эффектов сероводорода.

1. Ситдикова Г. Ф., Зефирова А. Л. Газообразные посредники в нервной системе // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2006. – **92**, № 7. – С. 872–882.
2. Kawabata A., Ishiki T., Nagasawa K. et al. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger // Pain. – 2007. – **132**. – P. 74–81.
3. Lowicka E., Beltowski J. Hydrogen sulfide the third gas of interest for pharmacologists // Pharmacol. Reports. – 2007. – **59**. – P. 4–24.
4. Geng B., Yang J., Qi Y. et al. H_2S generated by heart in rat and its effects on cardiac function // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – **313**, No 2. – P. 362–368.
5. Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals // Amino Acids. – 2004. – **26**. – P. 243–254.

6. Hosoki R., Matsuki N., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. – **237**, No 3. – P. 527–531.
7. Абрамочкин Д. В., Моусеенко Л. С., Кузьмин В. С. Влияние сероводорода на электрическую активность предсердного миокарда крысы // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* – 2009. – **147**, № 6. – С. 617–620.
8. Geng B., Chang L., Pan C. et al. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – **318**. – P. 756–763.
9. Pan T.-T., Neo K. L., Hu L.-F. et al. H₂S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2008. – **294**, No 1. – P. C169–C177.
10. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATp channel opener // *EMBO J.* – 2001. – **20**. – P. 6008–6016.
11. Сагач В. Ф., Шиманська Т. В., Надточій С. М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // *Фізіол. журн.* – 2003. – **49**, № 4. – С. 6–12.
12. Elsej D. J., Fowkes R. C., Baxter G. F. L-cysteine stimulates hydrogen sulphide synthesis in myocardium, associated with attenuation of ischemia-reperfusion injury // *J. Cardiovasc. Pharm. Therap.* – 2010. – **15**, No 1. – P. 53–59.
13. Guidotti T. L. Hydrogen sulphide // *Occup. Med. (Lond.)*. – 1996. – **46**, No 5. – P. 367–371.
14. Lim J. J., Liu Y. H., Khin E. S., Bian J. S. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2008. – **295**, No 5. – P. C1261–C1270.
15. Tan B. H., Wong P. T. H., Bian J. S. Hydrogen sulphide: A novel signaling molecule in the central nervous system // *Neurochem. Int.* – 2010. – **56**, No 1. – P. 3–10.

*Институт физиологии им. А. А. Богомольца
НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 07.06.2012

Т. В. Шиманська, Ю. В. Гошовська,
член-кореспондент НАН України **В. Ф. Сагач**

Вплив сірководню на функціональний стан і резервні можливості міокарда

В експериментах на ізольованих за методом Лангендорфа серцях щурів показано, що 15-хвилинна перфузія ізольованого серця донором сірководню гідросульфідом натрію в дозі 10^{-6} М призводить до розвитку депресорної реакції міокарда та виснаження його функціональних резервів, що супроводжується підвищенням чутливості мітохондріальних мембран кардіоміоцитів до дії іонів Ca^{2+} . Отримані результати свідчать про негативний вплив сірководню у застосованій концентрації на серцевий м'яз.

T. V. Shimanskaya, Y. V. Goshovska,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **V. F. Sagach**

Effect of hydrogen sulfide on the functional state and reserve capacity of heart

In experiments on isolated rat hearts by the Langendorff preparation, we demonstrate that a 15-minute perfusion of the H₂S donor, sodium hydrosulfide at 10^{-6} M, depresses the cardiac contractile activity and leads to the depletion of its functional reserve. H₂S-pretreated hearts show the increased sensitivity of mitochondrial membranes to Ca^{2+} . Thus, hydrogen sulfide in a dose of 10^{-6} M shows a toxic effect on the heart muscle.