

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА И ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ЭФФЕКТАХ СЕРОВОДОРОДА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ

© 2023 г. Д.М. Сорокина*, И.Ф. Шайдуллов*, А.Р. Гиззатуллин*,
Ф.Г. Ситдииков*, Г.Ф. Ситдикова*, #

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская,
18, Казань, Республика Татарстан, 420008, Россия

#E-mail: guzel.sitdikova@kpfu.ru

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 02.03.2023 г.

Принята к публикации 15.03.2023 г.

Исследована роль оксида азота, внутри- и внеклеточного кальция в эффектах сероводорода на спонтанные и вызванные карбахолином сокращения препарата тощей кишки крысы в условиях изометрического сокращения. Донор H_2S — гидросульфид натрия — приводил к снижению тонуса препарата, амплитуды и частоты спонтанных сокращений, а также параметров сокращений, вызванных неспецифическим агонистом рецепторов ацетилхолина карбахолином. В условиях ингибирования эндогенного синтеза NO с помощью L-NAME эффект донора H_2S сохранялся, тогда как на фоне действия SNAP, донора NO, эффекты NaHS на амплитуду спонтанных и вызванных карбахолином сокращений были выражены в меньшей степени. Снижение тонуса препарата при действии NaHS предотвращалось дантроленом, блокатором рианодиновых рецепторов. Бескальциевый раствор снижал ингибиторное влияние NaHS на сокращения, вызванные аппликацией карбахолина. Сделано предположение о том, что угнетающее влияние H_2S связано с динамикой внутриклеточной концентрации ионов кальция, а взаимодействие NO и H_2S реализуется на уровне общих мишеней действия двух газов.

Ключевые слова: сероводород, оксид азота, сократительная активность, тощая кишка крысы, вызванные карбахолином сокращения, кальций.

DOI: 10.31857/S0006302923050228, EDN: NAPRMD

Сероводород (H_2S) и оксид азота (NO) относятся к классу газомедиаторов наряду с монооксидом углерода (CO) [1]. H_2S обнаружен во многих системах, включая желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), где он синтезируется ферментами цистатинин-β-синтазой и цистатинин-γ-лиазой [2]. Третий ферментативный путь синтеза H_2S осуществляется 2-оксоглутарат-аминотрансферазой совместно с 3-меркаптопируват-сульфотрансферазой [3, 4]. Кроме того, H_2S продуцируется сульфатредуцирующими бактериями, являющимися частью нормальной энтеробактериальной флоры [2, 5–7]. Ферменты цистатинин-β-синтаза, цистатинин-γ-лиаза и 3-меркаптопируват-сульфотрансфераза экспрессируются повсеместно ЖКТ в различных типах клеток,

включая гладкомышечные, нейрональные, эпителиальные и интерстициальные клетки Кахала [8–10].

NO продуцируется ферментативно с помощью синтазы оксида азота, а также бактериальной микрофлорой и участвует в регуляции перистальтики кишечника, секреции слизистых желез, переваривания пищи, абсорбции и опорожнении кишечника [11]. Значительное число эфферентов энтеральной нервной системы млекопитающих содержат нейрональную синтазу оксида азота, а выделяющийся NO является неадренергическим и нехолинергическим тормозным нейромедиатором [11]. Известно, что H_2S также вызывает релаксацию гладких мышц ЖКТ и ингибирует перистальтику, путем активации калиевых каналов и гиперполяризации гладкомышечных клеток [8, 12–17].

Несмотря на наличие собственных механизмов влияния, эти два газомедиатора могут взаи-

Сокращения: ЖКТ — желудочно-кишечный тракт, L-NAME — NG-нитро-L-аргинин-метил-эфир, SNAP — S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин, ППК — площадь под кривой.

модействовать друг с другом как на уровне регуляции активности ферментов синтеза, так и мишенной действия [18, 19]. Так, эндогенная продукция H_2S в ткани аорты усиливалась при действии доноров NO [19], а взаимодействие H_2S и NO необходимы для ангиогенеза и вазодилатации [18], регуляции секреции и двигательной активности желудка [12, 20]. NO может активировать цистатионин- γ -лиазу/цистатионин- β -синтазу с последующим усилением продукции H_2S , а H_2S при этом ингибировал синтазу оксида азота и продукцию NO [19, 21, 22]. С другой стороны, H_2S обладает способностью ускорять высвобождение NO из S-нитрозоглутатиона [21, 22]. При этом донор NO ингибировал экспрессию цистатионин- β -синтазы [23], а H_2S снижал экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота [24].

Целью нашего исследования было выявление роли NO, а также механизмов, связанных с регуляцией внутриклеточного кальция, в эффектах H_2S на сократимость тощей кишки крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования по анализу спонтанной и вызванной сократительной активности проводили на изолированных сегментах тощей кишки крысы длиной 5–7 мм в изометрических условиях на установке фирмы Biopac Systems (США). Регистрацию и последующий анализ параметров сокращения препарата проводили с помощью программы AcqKnowledge 4.1. На протяжении всего эксперимента препарат омывался раствором Кребса, который содержал (в $mM \cdot l^{-1}$): NaCl – 121.0, KCl – 5.9, $CaCl_2$ – 2.5, $MgCl_2$ – 1.2, $NaHCO_3$ – 25.0, NaH_2PO_4 – 1.2, $C_6H_{12}O_6$ – 8.0 (Sigma, США) с постоянной подачей карбогена (95% O_2 и 5% CO_2), при температуре $37^\circ C$ и pH 7.2–7.4. После подвешивания препарат разрабатывали в течение 40–60 мин при напряжении 1 г до получения стабильных сокращений.

В качестве донора H_2S использовали гидросульфид натрия (NaHS, Sigma, США) в концентрации 200 мкМ. В экспериментах также использовали агонист рецепторов ацетилхолина – карбахолин в концентрации 1 мкМ, блокатор потенциал-зависимых Na^+ каналов – тетродоксин в концентрации 0.5 мкМ, неспецифический блокатор NO-синтазы – NG-нитро-L-аргинин-метил-эфир (L-NAME) в концентрации 100 мкМ, донор NO – S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP) в концентрации 50 мкМ, блокатор рианодиновых рецепторов – дантролен в концентрации 25 мкМ.

Анализировали амплитуду и частоту спонтанных сокращений, а также тонус сегмента тощей

кишки в контроле и при добавлении исследуемых веществ. Также оценивали амплитуду (в граммах) и площадь под кривой (ППК, в г·с) в течение 1 мин аппликации карбахолина в контроле и на фоне веществ. Реакцию препарата на введение исследуемых веществ рассчитывали в процентах от исходного значения. Параметры сократительной активности в контроле принимали за 100%, n указывает на количество препаратов. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех животных. Достоверность различий определяли с помощью парного t -критерия Стьюдента или дисперсионного анализа ANOVA с применением теста Бонферрони. Все данные представлены как среднее значение $\pm$ ошибка среднего. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Статистический анализ был выполнен с помощью программы OriginPro 2015 (Origin Lab, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние донора H_2S гидросульфида натрия на спонтанную и вызванную карбахолином сократительную активность препарата тощей кишки крысы. Препарат тощей кишки крысы в контроле характеризовался спонтанными сокращениями амплитудой 0.9 ± 0.08 г, возникающих с частотой 29.3 ± 0.6 сокращений $\cdot \text{мин}^{-1}$. Донор H_2S – NaHS – вызывал угнетение как спонтанных, так и вызванных карбахолином сокращений препаратов тощей кишки крысы, как было показано ранее [25]. NaHS в концентрации 200 мкМ приводил к снижению тонуса препарата до 76% (с 1.2 ± 0.09 г до 0.99 ± 0.05 г, $n = 19$, $p < 0.05$), амплитуды и частоты спонтанных сокращений – до 43% (с 0.9 ± 0.08 г до 0.4 ± 0.06 г, $n = 19$, $p < 0.05$) и 80% (с $29.3 \pm 0.6 \text{ мин}^{-1}$ до $23.4 \pm 1.1 \text{ мин}^{-1}$, $n = 19$, $p < 0.05$) соответственно, по отношению к контрольным значениям (рис. 1а). Эти эффекты полностью проявлялись и в присутствии блокатора потенциалзависимых Na^+ каналов тетродоксина: тонус препарата снижался до 60% (с 1.16 ± 0.09 г до 0.69 ± 0.04 г, $n = 19$, $p < 0.05$), амплитуда – до 30% (с 0.62 ± 0.06 г до 0.17 ± 0.01 , $n = 19$, $p < 0.05$) и частота – до 59% (с $26 \pm 0.26 \text{ мин}^{-1}$ до $15.5 \pm 0.8 \text{ мин}^{-1}$, $n = 19$, $p < 0.05$).

Аппликация карбахолина (1 мкМ) вызывала резкое увеличение тонического напряжения, которое достигнув максимального значения, снижалось и держалось на уровне плато. NaHS угнетал сокращение, вызванное карбахолином: ППК и амплитуда сокращения составили 59% (с 120.7 ± 6.4 г·с до 67.01 ± 3.04 г·с, $n = 37$, $p < 0.05$) и 64% (с 2.1 ± 0.1 г до 1.3 ± 0.08 г, $n = 37$; $p < 0.05$) соответственно по сравнению с эффектами карбахолина в контроле (рис. 1б).

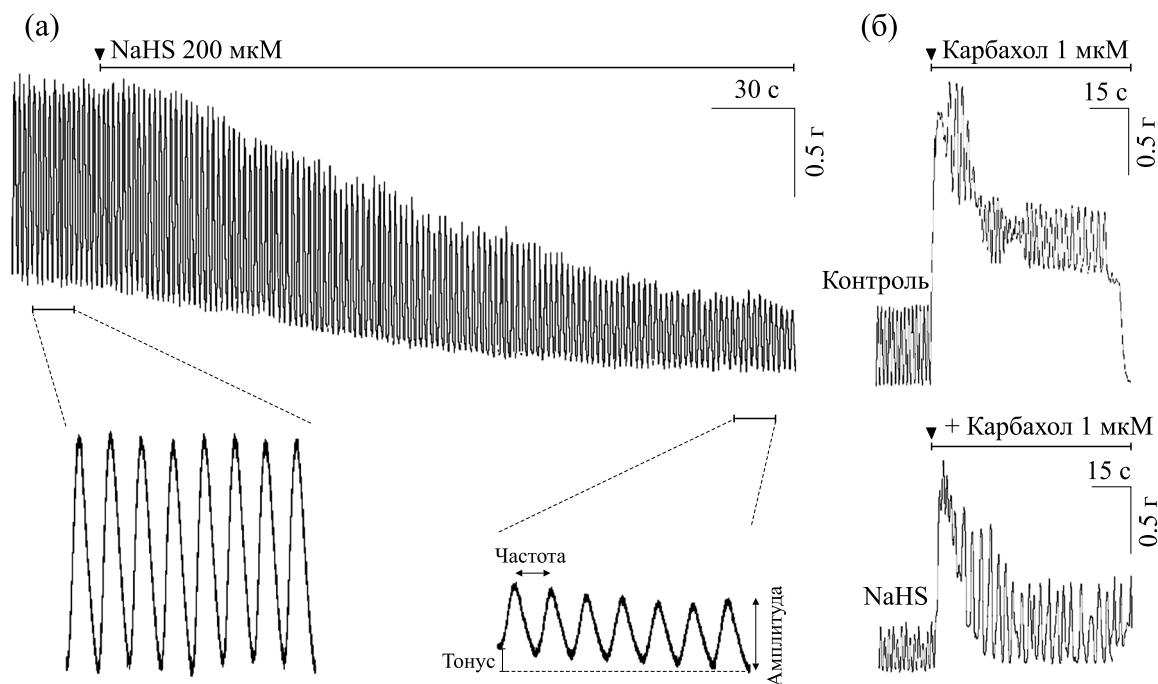


Рис. 1. Механограммы спонтанной и вызванной сократительной активности тощей кишки крысы при действии NaHS в концентрации 200 мкМ. (а) — Изменение спонтанной сократительной активности в условиях аппликации NaHS. На врезках показаны сокращения на расширенной временной шкале в контроле и к 7 мин аппликации NaHS. На графике обозначены тоническое напряжение препарата и параметры спонтанных сокращений. (б) — Изменение вызванной карбахолином (1 мкМ, 1 мин) сократительной активности на фоне действия NaHS. Горизонтальная линия указывает на продолжительность действия вещества.

Роль NO в эффектах NaHS. Для ингибирования эндогенного синтеза NO использовали L-NAME в концентрации 100 мкМ, аппликация которого приводила к повышению амплитуды спонтанных сокращений до 119% ($n = 32$, $p < 0.05$) от начального уровня, при этом тоническое напряжение препарата и частота спонтанных сокращений не изменялись ($n = 34$, $p > 0.05$) (табл. 1). На фоне L-NAME ингибирующие эффекты NaHS на тонус спонтанных сокращений сохранялись ($n = 18$, $p > 0.05$) (рис. 2а, табл. 1). Экзогенный донор NO — SNAP — в концентрации 50 мкМ приводил к снижению амплитуды к 30-й секунде до 55% ($n = 22$, $p < 0.05$), после чего происходило восстановление амплитуды до исходных значений ($n = 22$, $p > 0.05$), при этом тонус препарата и частота спонтанных сокращений не изменялись ($n = 22$, $p > 0.05$, табл. 1). На фоне SNAP эффект NaHS на амплитуду спонтанных сокращений был выражен в меньшей степени (84%, $n = 11$, $p < 0.05$), а на тонус препарата (100%, $n = 11$, $p > 0.05$) и частоту сокращений — не проявлялся (94%, $n = 9$, $p > 0.05$, рис. 2а, табл. 1).

Аппликация L-NAME или SNAP не влияла на амплитуду и ППК вызванного карбахолином сокращения ($n = 15$, $p > 0.05$, табл. 2). Угнетающий эффект NaHS на ответ, вызванный карбахолином, на фоне L-NAME сохранялся ($n = 27$,

$p < 0.05$, рис. 2б, табл. 2), на фоне действия SNAP был выражен в меньшей степени на ППК ($n = 12$, $p < 0.05$), а на амплитуду вызванных карбахолином сокращений не проявлялся ($n = 12$, $p > 0.05$, рис. 2б, табл. 2).

Роль ионов кальция в эффектах сероводорода на параметры спонтанных и вызванных карбахолином сокращений тощей кишки крысы. Для анализа роли внутриклеточных Ca^{2+} -депо в эффектах NaHS использовали дантролен в концентрации 25 мкМ, который снижает высвобождение кальция из саркоплазматического ретикулума за счет ингибирования рианодиновых рецепторов [26]. Добавление дантролена не приводило к изменению тонического напряжения (93%, $n = 17$, $p > 0.05$), амплитуды (103%, $n = 13$, $p > 0.05$) и частоты спонтанных сокращений (94%, $n = 15$, $p > 0.05$, табл. 1). На фоне дантролена эффекты донора H_2S на амплитуду (50%, $n = 8$, $p < 0.05$) и частоту спонтанных сокращений сохранялись (91%, $n = 7$, $p < 0.05$), а на тоническое напряжение (96%, $n = 8$, $p > 0.05$, рис. 3а, табл. 1) не проявлялся. Для анализа роли внеклеточного Ca^{2+} в эффектах NaHS использовали бескальциевый раствор. Замещение нормального раствора на раствор, не содержащий Ca^{2+} , характеризовалось снижением тонического напряжения препарата от 1.38 ± 0.13 г

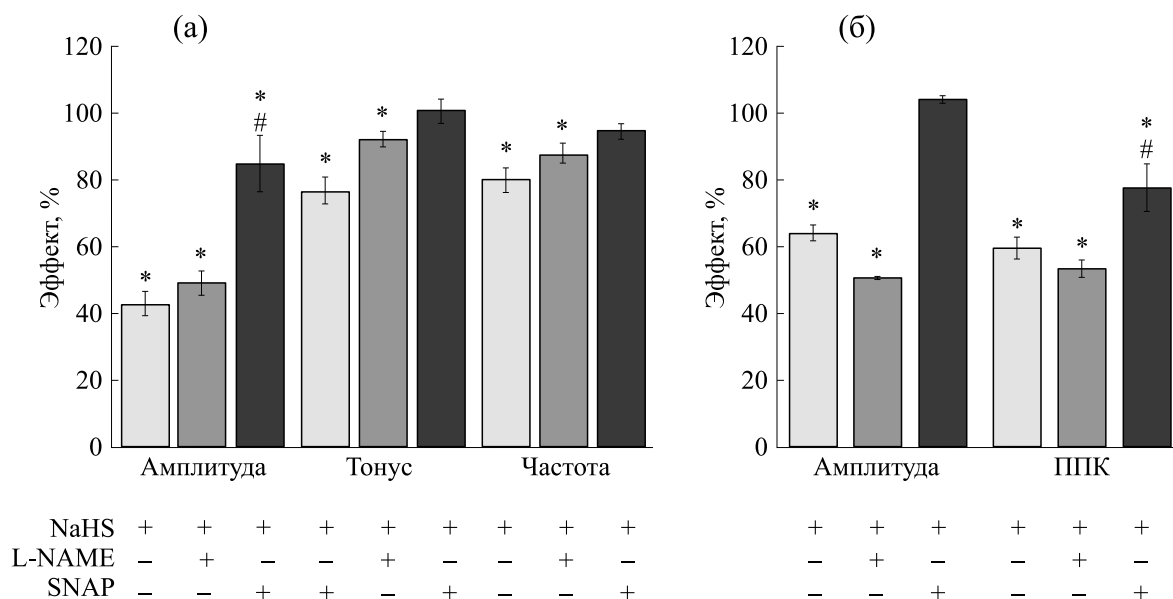


Рис. 2. Роль NO в эффектах донора H_2S на спонтанные и вызванные карбахолином сокращения тощей кишки крысы. (а) — Изменение тонуса препарата, амплитуды и частоты спонтанных сокращений при действии NaHS (200 мкМ) в контроле (белые столбики), NaHS на фоне блокатора NO-синтазы L-NAME (100 мкМ, серые столбики) и донора NO S-нитрозо-N-ацетилпенициллина (SNAP) (50 мкМ, черные столбики). * — $p < 0.05$ относительно начальных значений (100%), # — $p < 0.05$ по отношению к эффектам NaHS в контроле. (б) — Амплитуда и ППК вызванных карбахолином сокращений при действии NaHS (200 мкМ) в контроле (белые столбики), NaHS на фоне L-NAME (100 мкМ, серые столбики) и донора NO SNAP (50 мкМ, черные столбики). * — $p < 0.05$ по отношению к значениям, полученным при действии карбахолина в контроле (100%), # — $p < 0.05$ по отношению к карбахолин вызванному сокращению на фоне NaHS.

до 1.13 ± 0.10 г ($n = 12$, $p < 0.05$) и практически полным угнетением спонтанных сокращений, поэтому анализировали влияние NaHS только на тонус. В бескальциевом растворе ингибирующий эффект NaHS на тонус сохранялся (78%; $n = 8$, $p < 0.05$, рис. 3а).

На фоне предварительной аппликации дантролена параметры вызванного карбахолином сокращения не отличались от контроля ($n = 12$, $p > 0.05$) (табл. 2). На фоне действия дантролена ингибирующие эффекты NaHS на карбахолин вызванные сокращения сохранялись ($n = 12$,

Таблица 1. Роль NO и ионов Ca^{2+} в эффектах NaHS на спонтанную сократительную активность тощей кишки крысы

Амплитуда, г	Контроль 0.86 ± 0.04	L-NAME $1 \pm 0.06^*$	L-NAME + NaHS $0.46 \pm 0.05^*$
Тоническое напряжение, г	0.90 ± 0.02	0.87 ± 0.05	$0.81 \pm 0.04^*$
Частота, мин ⁻¹	30.25 ± 0.67	28.25 ± 0.73	$24.8 \pm 1.17^*$
Амплитуда, г	Контроль 0.74 ± 0.06	SNAP 0.80 ± 0.06	SNAP + NaHS $0.64 \pm 0.06^{* \#}$
Тоническое напряжение, г	1.28 ± 0.08	1.20 ± 0.08	1.19 ± 0.08
Частота, мин ⁻¹	28.73 ± 0.47	26 ± 0.46	24.66 ± 0.60
Тоническое напряжение, г	Контроль 1.38 ± 0.13	[Ca ²⁺] = 0 1.13 ± 0.10	[Ca ²⁺] = 0, NaHS 1.01 ± 0.11
Амплитуда, г	Контроль 0.68 ± 0.10	Дантролен 0.67 ± 0.09	Дантролен + NaHS $0.31 \pm 0.08^*$
Тоническое напряжение, г	1.08 ± 0.09	1.01 ± 0.09	0.83 ± 0.09
Частота, мин ⁻¹	31.2 ± 0.57	29.40 ± 0.70	28 ± 0.97

Примечание. * — $p < 0.05$ по отношению к исходным значениям, # — $p < 0.05$ по отношению к эффекту NaHS в контроле.

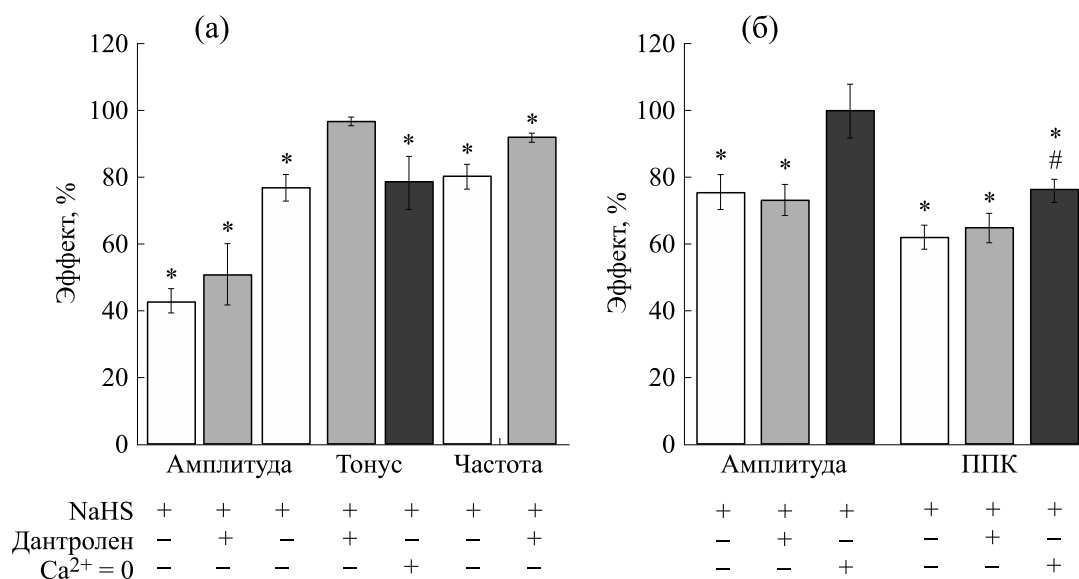


Рис. 3. Роль ионов кальция в эффектах NaHS на сократительную активность тощей кишки крысы. (а) — Изменение параметров спонтанных сокращений при действии NaHS (200 мкМ) в бескальциевом растворе (черный столбик) и на фоне дантролена (25 мкМ, серые столбики). * — $p < 0.05$ относительно исходных значений (100%), # — $p < 0.05$ по отношению к эффектам NaHS в контроле (белые столбики). (б) — Амплитуда и ППК вызванных карбахолином сокращений при действии NaHS (200 мкМ) в контроле (белые столбики), на фоне действия дантролена (100 мкМ, серые столбики) и в бескальциевом растворе (черные столбики). * — $p < 0.05$ по отношению к значениям, полученным при действии карбахолина в контроле (100%), # — $p < 0.05$ — по отношению к вызванному карбахолином сокращению на фоне NaHS.

$p < 0.05$, рис. 3б, табл. 2). В бескальциевом растворе амплитуда и ППК сокращения, вызванного карбахолином, снижались до 74% ($n = 16$, $p < 0.05$)

и 73% ($n = 16$, $p < 0.05$) соответственно (табл. 2). Последующая аппликация NaHS не приводила к изменению амплитуды карбахолин вызванных

Таблица 2. Роль NO и ионов Ca²⁺ в эффектах NaHS на вызванные карбахолином сокращения тощей кишки крысы

Параметры	Контроль (Карбахолин)		NaHS + Карбахолин
Амплитуда, г	2.15 ± 0.12		1.36 ± 0.08*
Площадь под кривой, г·с	120.75 ± 6.46		67.01 ± 3.04*
		L-NAME + карбахолин	L-NAME + NaHS + карбахолин
Амплитуда, г	2.23 ± 0.11	2.10 ± 0.17	1.06 ± 0.13*
Площадь под кривой, г·с	125.10 ± 6.50	103.96 ± 8.20*	55.64 ± 2.63*
		SNAP + карбахолин	SNAP + NaHS + карбахолин
Амплитуда, г	1.81 ± 0.16	1.80 ± 0.16	1.87 ± 0.16
Площадь под кривой, г·с	118.76 ± 8.90	116.00 ± 8.55	90.15 ± 7.00*#
		Дантролен + карбахолин	Дантролен + NaHS + карбахолин
Амплитуда, г	1.52 ± 0.27	1.36 ± 0.30	0.99 ± 0.14*
Площадь под кривой, г·с	93.17 ± 13.88	88.50 ± 13.68	57.21 ± 5.46*
		[Ca ²⁺] = 0, + карбахолин	[Ca ²⁺] = 0, NaHS + Карбахолин
Амплитуда, г	2.01 ± 0.15	1.41 ± 0.10*	1.25 ± 0.13
Площадь под кривой, г·с	110.68 ± 8.97	77.66 ± 4.40*	58.70 ± 3.99*#

Примечание. * — $p < 0.05$ по отношению к значениям, полученным при действии карбахолина в контроле, # — $p < 0.05$ — по отношению к вызванному карбахолином сокращению на фоне NaHS.

сокращений (99%; $n = 16$; $p > 0.05$), его эффект на ППК был выражен в меньшей степени, чем в контроле (75%, $n = 16$, $p < 0.05$; рис. 36, табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимодействие газовых сигнальных молекул NO и H_2S показано во многих системах нашего организма [1, 22, 27–30]. В нашей работе мы исследовали роль NO и внутриклеточного кальция в эффектах H_2S на спонтанные и вызванные карбахолином сокращения тощей кишки крысы. H_2S на сегодняшний день является общепризнанной сигнальной молекулой, которая синтезируется в ЖКТ и регулирует двигательную активность, процессы секреции, абсорбции [31, 32], а также играет роль в развитии различных патологических процессов, таких как синдром раздраженного кишечника, воспалительные заболевания, язва желудка и двенадцатиперстной кишки, язвенный колит, болезнь Крона, ожирение и рак [33, 34]. Было показано, что инъекции NaHS, донора H_2S , заметно облегчают воспаление и окислительный стресс при постинфекционном синдроме раздраженного кишечника [35], а снижение продукции H_2S приводит к усилению перистальтики.

H_2S повсеместно продуцируется в ЖКТ [36] и оказывает преимущественно расслабляющие эффекты на двигательную активность [37, 38], а его клеточные мишени зависят от участка ЖКТ, продольных или кольцевых мышечных волокон и вида, используемого в эксперименте животного [15–17, 25, 38]. В нашем исследовании донор H_2S вызывал расслабление препарата тощей кишки крысы, снижая спонтанную активность и вызванные карбахолином сокращения, что согласуется с ранее полученными данными [8, 12, 15, 25].

В ряде работ предположено участие NO в механизмах действия H_2S в различных тканях [25, 27, 39, 40]. В желудочно-кишечном тракте NO является основным тормозным медиатором неадренергической, нехолинергической передачи наряду с вазоинтестинальным пептидом и пуринами [11, 41]. Синтаза оксида азота экспрессируется в соме и варикозных расширениях нейронов энтеральной нервной системы и синтезирует NO в ответ на повышение уровня кальция [41, 42]. Для анализа роли NO в эффектах H_2S использовали ингибитор синтазы оксида азота — L-NAME, аппликация которого вызывала повышение амплитуды спонтанных сокращений, что указывает на тоническое выделение NO из нервных окончаний [43]. Ингибиторные эффекты H_2S полностью сохранялись на фоне действия L-NAME и также на фоне тетродотоксина, что свидетельствует о прямом действии NaHS на гладкомышечные клетки. Аппликация донора NO на препарат тощей киш-

ки крысы вызывал кратковременное угнетение амплитуды спонтанных сокращений, после чего она возвращалась к исходным значениям. Сходные эффекты были продемонстрированы и в тощей кишке мыши и человека, и этот эффект блокировался ODQ [43, 44], тогда как в циркулярных мышцах тощей кишки крысы донор NO не оказывал существенного влияния на спонтанную активность [45]. В присутствии донора NO эффекты NaHS на амплитуду спонтанных и вызванных карбахолином сокращений были выражены в меньшей степени. Можно предположить, что предварительная аппликация донора NO вызывает активацию внутриклеточных сигнальных путей, общих для NO и H_2S , что снижает эффективность действия NaHS. Большинство эффектов NO в ЖКТ опосредуется NO-чувствительной гуанилатциклазой, которая экспрессируется в гладкомышечных клетках [11, 46–48]. Активация расщелимой гуанилатциклазы приводит к синтезу цГМФ, мишенью которого являются три группы белков — цГМФ-зависимая протеинкиназа, цГМФ-регулируемая фосфодиэстераза и цГМФ-зависимые ионные каналы [48, 49]. цГМФ-регулируемая фосфодиэстераза 3 (цГМФ ингибируемая расщепляющая цАМФ) была показана в гладкомышечных клетках ЖКТ и интерстициальных клетках Кахалы [48, 50] и может опосредовать взаимодействие между NO/цГМФ- и цАМФ-сигнализацией, и таким образом действовать на мишени цАМФ (например, HCN-каналы) [48]. цГМФ-зависимая протеинкиназа 1 повсеместно экспрессируется в гладкомышечных клетках и вызывает расслабление преимущественно путем снижения уровня Ca^{2+} , угнетая выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо или вход Ca^{2+} из внеклеточного пространства [48]. Так, механизмы расслабления продольных гладкомышечных клеток желудка крысы при действии нитропруссид натрия связаны с освобождением Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулаума через рианодиновые рецепторы и входом Ca^{2+} через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы L-типа [51, 52]. Поэтому далее анализировали роль внутри- и внеклеточного Ca^{2+} в эффектах NaHS.

Тоническое напряжение и амплитуда спонтанных сокращений гладкомышечных клеток определяется мембранным потенциалом покоя и уровнем внутриклеточного Ca^{2+} [53, 54]. Действительно, снижение тонуса препарата тощей кишки при действии NaHS предотвращалось в присутствии блокатора рианодиновых рецепторов — дантролена, тогда как в бескальциевом растворе эффект NaHS сохранялся. Однако бескальциевый раствор снижал ингибиторный эффект NaHS на сокращения, вызванные аппликацией карбахолина. По-видимому, H_2S может влиять

как на вход Ca^{2+} в гладкомышечные клетки, так и на его высвобождение из саркоплазматического ретикула [55]. Известно, что H_2S является активатором K^+ -каналов различных типов [15–17]. Это может приводить к гиперполяризации мембраны или ускорению реполяризации, что будет вызывать снижение входящего Ca^{2+} -тока через потенциал зависимые Ca^{2+} -каналы. Кроме того, не исключено и непосредственное ингибирующее влияние H_2S на Ca^{2+} -каналы L-типа [10]. Снижение уровня Ca^{2+} будет приводить к изменению активности киназы/фосфатазы легких цепей миозина и, как следствие, к снижению эффективности работы сократительных белков [56].

Спонтанная активность гладкомышечных клеток в ЖКТ определяется ритмическими изменениями потенциала мембраны, так называемыми медленными волнами, в генерации которых ключевую роль играют интерстициальные клетки Кахаля, образующие щелевые контакты с низким сопротивлением с гладкомышечными клетками [11]. NaHS вызывал угнетение частоты спонтанной активности препарата тощей кишки, и этот эффект не изменялся значительно ни при воздействии на синтез NO , ни при изменении уровня Ca^{2+} в гладкомышечных клетках, однако предотвращался в присутствии донора NO . По-видимому, действие NaHS связано с прямыми эффектами газа на интерстициальные клетки Кахаля, который в больших концентрациях угнетал пейсмекерную активность в интерстициальных клетках Кахаля тонкого кишечника мыши [57].

Таким образом, донор H_2S — NaHS — вызывает снижение тонуса, частоты и амплитуды спонтанных сокращений препарата тощей кишки крысы, а также сокращения, вызванные активацией мускариновых рецепторов карбахолом. Ингибиторные эффекты H_2S реализуются непосредственно на гладкомышечные клетки, так как сохраняются в присутствии тетродотоксина и блокатора NO -синтазы, однако снижаются в присутствии донора NO , что может быть связано с его влиянием на NO -зависимые механизмы регуляции сократительной активности. Механизмы действия H_2S связаны с изменением уровня внутриклеточного Ca^{2+} вследствие его высвобождения из саркоплазматического ретикула или входа через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета («ПРИОРИТЕТ-2030»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проведены в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (86/609/ЕЕС) и одобрены локальным этическим комитетом КФУ (протокол № 8 от 05.05.2015; протокол №33 от 25.11.2021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Hermann, G. F. Sitdikova, and T. M. Weiger, *Gastrotransmitters Physiol. Pathophysiol.*, 1–204 (2013).
2. M. Jimenez, V. Gil, M. Martinez-Cutillas, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **174**, 2805 (2017).
3. M. H. Stipanuk and P. W. Beck, *Biochem. J.*, **206**, 267 (1982).
4. N. Shibuya, M. Tanaka, M. Yoshida, et al., *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 703 (2009).
5. K. Sudha, S. Anitta, P. M. Devi, and G. Thejomayah, *Int. J. Soc. Sci. Interdiscip. Res.*, **4**, 165 (2015).
6. D. R. Yarullina, R. O. Mikheeva, G. I. Sabirullina, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **160**, 343 (2016).
7. G. Sitdikova, A. Hermann, A. Yakovlev, *Uchenye Zap. Kazan. Univ. Seriya Estestv. Nauk*, **160**, 686 (2018).
8. M. S. Kasperek, D. R. Linden, G. Farrugia, and M. G. Sarr, *J. Surg. Res.*, **175**, 234 (2012).
9. L. Sha, D. R. Linden, G. Farrugia, and J. H. Szurszewski, *J. Physiol.*, **592**, 1077 (2014).
10. X. Quan, H. Luo, Y. Liu, et al., *PLoS One*, **10**, e0121331 (2015).
11. K. M. Sanders and S. M. Ward, *Br. J. Pharmacol.*, **176**, 212 (2019).
12. D. Gallego, P. Clavé, J. Donovan, et al., *Neurogastroenterol. Motil.*, **20**, 1306 (2008).
13. M. Nagao, J. A. Duenes, and M. G. Sarr, *J. Gastrointest. Surg.*, **16**, 334 (2012).
14. G. F. Sitdikova, N. N. Khaertdinov, and A. L. Zefirov, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **151**, 163 (2011).
15. М. У. Шафигуллин, Р. А. Зефиров, Г. И. Сабируллина и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **157**, 275 (2014).
16. Г. И. Сабируллина, М. У. Шафигуллин, Н. Н. Хаертдинов и др., *Вестник науки Сибири*, № 15, 339 (2015).
17. И. Ф. Шайдуллов, М. У. Шафигуллин, Д. М. Габитова, и др., *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **54**, 355 (2018).
18. C. Coletta, A. Papapetropoulos, K. Erdelyi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9161 (2012).
19. W. Zhao, R. Wang, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283** (2), H474 (2002).
20. K. Takeuchi, E. Aihara, M. Kimura, et al., *Curr. Med. Chem.*, **19**, 43 (2012).
21. M. Y. Ali, C. Y. Ping, Y. Y. P. Mok, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **149**, 625 (2006).
22. Z. Wang, Y. Yan, Y. Wang, and F. Tong, *Biomed. Pharmacother.*, **112**, 108736 (2019).

23. G. A. Prathapasinghe, Y. L. Siow, Z. Xu, and O. Karmin, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **295** (4), F912 (2008), DOI: 10.1152/AJPRENAL.00040.2008
24. G. K. Kolluru, X. Shen, and C. G. Kevil, *Redox Biol.*, **1**, 313 (2013).
25. Д. М. Габитова, И. Ф. Шайдуллов, Г. И. Сабируллина и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **160**, 18 (2017).
26. F. Zhao, P. Li, S. R. W. Chen, et al., *J. Biol. Chem.*, **276**, 13810 (2001).
27. M. L. Lo Faro, B. Fox, J. L. Whatmore, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **41**, 38 (2014).
28. B. V. Nagpure and J. S. Bian, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **230**, 193 (2015).
29. A. Walewska, A. Szewczyk, and P. Koprowski, *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (10), 3227 (2018).
30. D. Wu, Q. Hu, and D. Zhu, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2018**, ID 4579140 (2018).
31. D. R. Linden, M. D. Levitt, G. Farrugia, and J. H. Szurszewski, *Antioxid. Redox Signal.*, **12**, 1135 (2010).
32. R. Wang, *Physiol. Rev.*, **92**, 791 (2012).
33. S. B. Singh and H. C. Lin, *Microorganisms*, **3**, 866 (2015).
34. J. E. Belizário and J. Faintuch, *Exp. Suppl.*, **109**, 459 (2018).
35. S. Yang, D. Deng, Y. Luo, et al., *RSC Adv.*, **6**, 64208 (2016).
36. G. R. Martin, G. W. McKnight, M. S. Dicay, et al., *Dig. Liver Dis.*, **42**, 103 (2010).
37. R. Hosoki, N. Matsuki, and H. Kimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 527 (1997).
38. I. Dhaese, I. Van Colen, and R. A. Lefebvre, *Eur. J. Pharmacol.*, **628**, 179 (2010).
39. L. T. Lucetti, R. O. Silva, A. P. M. Santana, et al., *Dig. Dis. Sci.*, **62**, 93 (2017).
40. Y. Q. Huang, H. F. Jin, H. Zhang, et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1315**, 205 (2021).
41. E. Idrizaj, C. Traini, M. G. Vannucchi, and M. C. Bacari, *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (2021).
42. T. Okamoto, M. J. Barton, G. W. Hennig, et al., *Neurogastroenterol. Motil.*, **26**, 556 (2014).
43. N. J. Zyromski, M. L. Kendrick, D. M. Nagorney, et al., *J. Gastrointest. Surg.*, **5**, 588 (2001).
44. T. Ueno, J. A. Duenes, A. E. Zarroug, and M. G. Sarr, *J. Gastrointest. Surg.*, **8**, 831 (2004).
45. B. M. Balsiger, J. A. Duenes, N. Obtani, et al., *J. Gastrointest. Surg.*, **4**, 86 (2000).
46. S. Moncada, R. M. Palmer, and E. A. Higgs, *Pharmacol. Rev.*, **43** (1991).
47. T. Ördög, S. M. Ward, and K. M. Sanders, *J. Physiol.*, **518**, 257 (1999).
48. D. Groneberg, B. Voussen, and A. Friebe, *Curr. Med. Chem.*, **23**, 2715 (2016).
49. S. H. Francis, J. L. Busch, and J. D. Corbin, *Pharmacol. Rev.*, **62**, 525 (2010).
50. K. Y. So, S. H. Kim, H. M. Sohn, et al., *Mol. Cells*, **27**, 525 (2009).
51. J. Geeson, K. Larsson, S. M. O. Hourani, and N. J. Toms, *Auton. Autacoid Pharmacol.*, **22**, 297 (2002).
52. J. G. De Man, B. Y. De Winter, A. G. Herman, and P. A. Pelckmans, *Br. J. Pharmacol.*, **150**, 88 (2007).
53. C. E. Van Hove, C. Van Der Donckt, A. G. Herman, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **158**, 920 (2009).
54. A. L. Gonzales and S. Earley, *Microcirculation*, **20**, 337 (2013).
55. I. Castro-Piedras and J. F. Perez-Zoghbi, *J. Physiol.*, **591**, 5999 (2013).
56. K. S. Murthy, *Annu. Rev. Physiol.*, **68**, 345 (2006).
57. P. J. Yoon, S. P. Parajuli, D. C. Zuo, et al., *Chonnam Med. J.*, **47**, 72 (2011).

Role of Nitric Oxide and Calcium Ions in the Effects of Hydrogen Sulfide on Contractile Activity of Rat Jejunum

D.M. Sorokina*, I.F. Shaidullov*, A.R. Gizzatullin*, F.G. Sitdikov*, and G.F. Sitdikova*

Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, Republic of Tatarstan, 420008 Russia

This study was performed to explore the role of nitric oxide, intracellular and extracellular calcium in the effects of hydrogen sulfide on spontaneous and carbachol-induced contractions of a rat jejunum preparation during a isometric contraction. Application of H₂S donor, sodium hydrosulfide, led to a decrease in tonic tension, the amplitude and frequency of spontaneous contractions, as well as in the amplitude induced by carbachol, a nonspecific acetylcholine receptor agonist. Inhibiting the production of endogenous NO synthesis by with L-NAME, the effect of H₂S donor remained unchanged, while in the presence of SNAP, a NO donor, the effects of NaHS on the amplitude of spontaneous and carbachol-induced contractions were less pronounced. Dantrolene, a ryanodine receptor inhibitor was used to stop a decrease in tonic tension in the presence of NaHS. The calcium-free solution reduced the inhibitory effect of NaHS on carbachol-induced contractions. This suggests that the inhibitory effect of H₂S is associated with the dynamics of the intracellular concentration of calcium ions, and the interaction between NO and H₂S occurs at the level of common targets of two gases.

Keywords: hydrogen sulfide, nitric oxide, contractile activity, rat jejunum, carbachol-induced contractions, calcium