

ISSN 2313-1829

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Гены & Клетки

Том IX, № 3, 2014

Журнал рекомендован ВАК Министерства образования
и науки РФ для опубликования основных научных
результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора
и кандидата наук

Журнал включен в российские и международные
библиографические и реферативные базы данных:
eLIBRARY (www.elibrary.ru), Scopus (www.scopus.com),
EBSCO (www.ebsco.com)

Партнеры издания:

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна
ФМБА России

© Институт стволовых клеток человека, 2014

СОДЕРЖАНИЕ ЧАСТИ «А»

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>ИСТОРИЯ 8</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Зорин В.Л., Зорина А.И.</i></p> <p style="padding-left: 20px;">К 90-летию Александра Яковлевича Фриденштейна..... 8</p> <p>ОБЗОРЫ 11</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Корсаков И.Н., Зорин В.Л., Еремин И.И., Зорина А.И., Котенко К.В., Копнин П.Б., Пулин А.А.</i></p> <p style="padding-left: 20px;">Клеточные технологии для восстановления мышечной ткани. Часть I: миокард..... 11</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Павельев М.Н., Балтина Т.В.</i></p> <p style="padding-left: 20px;">Рецепторы хондроитинсульфат протеогликанов в нервной системе 18</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Плюшкина А.С., Калигин М.С.</i></p> <p style="padding-left: 20px;">Возможности использования стволовых клеток в лечении сахарного диабета..... 22</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Рожина Э.В., Данилушкина А.А., Науменко Е.А., Львов Ю.М., Фахруллин Р.Ф.</i></p> <p style="padding-left: 20px;">Нанотрубки галлуазита – перспективный биосовместимый материал для «умных» композитов с инкапсуляцией биологически активных веществ 25</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Шарипова Э.И., Газизов И.М., Гумерова А.А., Киясов А.П.</i></p> <p style="padding-left: 20px;">Перибиллиарные железы желчных протоков как ниша мультипотентных стволовых клеток 29</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф.</i></p> <p style="padding-left: 20px;">Физиологическая роль сероводорода в нервной системе 34</p> <p>ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ..... 41</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Абдулхакова А.Р., Галявиева А.Р., Абдулхаков С.Р., Трондин А.А., Певнев Г.О., Титова М.А., Гумерова А.А., Киясов А.П.</i></p> <p style="padding-left: 20px;">Роль звездчатых клеток поджелудочной железы в регенерации органа на фоне медь-дефицитной диеты у крыс 41</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Арутюнян И.В., Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х., Макаров А.В., Кананыхина Е.Ю., Большакова Г.Б., Глинкина В.В., Гольдштейн Д.В., Сухих Г.Т.</i></p> <p style="padding-left: 20px;">Элиминация РКН26-меченных ММСК при аллогенной трансплантации..... 45</p> | <p><i>Бурганова Г.Р., Титова А.А., Шарипова Э.И., Певнев Г.О., Мавликеев М.О., Газизов И.М., Галявиева А.Р., Шафигуллина А.К., Калигин М.С., Титова М.А., Гумерова А.А., Киясов А.П.</i></p> <p>Влияние трансплантации перисинусоидальных клеток печени на регенерацию печени крыс после повреждения четыреххлористым углеродом и 2-ацетиламинофлуореном 53</p> <p><i>Газизов И.М., Салафутдинов И.И., Мавликеев М.О., Баширов Ф.В., Исламов Р.Р., Ризванов А.А., Киясов А.П.</i></p> <p>Трансплантация генетически модифицированных мононуклеарных клеток пуповиной крови человека и прямая генная терапия при регенерации кожных ран у крыс 59</p> <p><i>Дудкина Е.В., Сайн И., Ульянова В.В., Шах Махмуд Р., Баррето Г., Ильинская О.Н.</i></p> <p>Трансформированные эпителиальные клетки легких – продуценты микробной РНКазы (биназы) 63</p> <p><i>Закирова Е.Ю., Журавлева М.Н., Масгутов Р.Ф., Усманов Р.А., Ризванов А.А.</i></p> <p>Выделение, анализ и применение аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани собаки для лечения локтевого сустава большеберцовой кости 70</p> <p><i>Зорин В.Л., Еремин И.И., Рыбко В.А., Зорина А.И., Котенко К.В., Пулин А.А., Копнин П.Б.</i></p> <p>Слизистая оболочка полости рта – новый источник получения миобластов 76</p> <p><i>Калигин М.С., Титова А.А., Плюшкина А.С., Титова М.А., Гумерова А.А., Киясов А.П.</i></p> <p>Пролиферация клеток поджелудочной железы при экспериментальном диабете 85</p> <p><i>Каюмов А.Р., Светгараева А.А., Маркелов О.А., Богачев М.И.</i></p> <p>Статистические закономерности мозаичной организации эукариотической ДНК..... 89</p> <p><i>Лифанова А.С., Н.Н. Хаертдинов, А.В. Захаров, Гиззатуллин А.Р., Ситдикова Г.Ф.</i></p> <p>Роль калиевых каналов в отрицательном инотропном эффекте сероводорода в предсердии мыши 94</p> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

РОЛЬ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В ОТРИЦАТЕЛЬНОМ ИНОТРОПНОМ ЭФФЕКТЕ СЕРОВОДОРОДА В ПРЕДСЕРДИИ МЫШИ

А.С. Лифанова¹, Н.Н. Хаертдинов¹, А.В. Захаров^{1,2}, А.Р. Гиззатуллин¹, Г.Ф. Ситдикова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Role of potassium channels in the negative inotropic effect of hydrogen sulfide in mouse atrium

A.S. Lifanova¹, N.N. Khaertdinov, A.V. Zakharov^{1,2}, A.R. Gizzatullin¹, G.F. Sitdikova¹

¹Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

²Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Исследовали влияние гидросульфида натрия (NaHS) — донора сероводорода (H₂S) на силу сокращения изолированных предсердий мыши. NaHS при кумулятивной аппликации в концентрациях 100, 200, 300 мкМ оказывал доза-зависимое действие, выражающееся в уменьшении амплитуды сокращений, максимальной скорости сокращения и расслабления миокарда. Субстрат синтеза H₂S — L-цистеин в концентрациях 1, 10, 50 мкМ также оказывал отрицательный инотропный эффект, тогда как блокатор фермента синтеза H₂S — β-цианоаланин вызывал усиление силы сокращения. Ингибирование K-каналов тетраэтиламмонием (2 мМ) приводило к усилению амплитуды сокращения миокарда и уменьшению отрицательного инотропного эффекта NaHS во всех использованных концентрациях. В условиях ингибирования АТФ-зависимых K-каналов глибенкламидом эффект NaHS не проявлялся в концентрации 100 мкМ, значительно снижался в концентрации 200 мкМ и полностью сохранялся в концентрации 300 мкМ. Активация АТФ-зависимых K-каналов диазоксидом не влияла на проявление отрицательного инотропного эффекта NaHS. Полученные данные свидетельствуют, что в миокарде предсердий мыши экзогенный и эндогенный H₂S вызывает уменьшение силы сокращений, которое опосредуется активацией АТФ-зависимых, кальций-активируемых или потенциал-зависимых K-каналов.

Ключевые слова: сероводород, сократимость миокарда, АТФ-зависимые калиевые каналы, потенциал-зависимые калиевые каналы, кальций-активируемые калиевые каналы, L-цистеин.

Сероводород (H₂S) — это эндогенная сигнальная молекула, влияющая на целый ряд физиологических и патологических процессов в нервной, сердечно-сосудистой, эндокринной системах, пищеварительном тракте [1–8]. В настоящее время H₂S вместе с оксидом азота и монооксидом углерода образуют группу газомедиаторов, обладающих уникальными свойствами и опосредующих внутри- и межклеточную передачу сигнала [9–13]. H₂S образуется в ходе метаболизма серосодержащих аминокислот ферментами цистатионин β-синтаза (ЦБС), цистатионин γ-лиаза (ЦГЛ) и 3-меркаптопируватсульфотрансфераза [5]. ЦБС доминирует в мозге, тогда как ЦГЛ — основной H₂S-продуцирующий фермент в сердечно-сосудистой системе, где он обнаруживается в гладкой мускулатуре, эндотелии и миокарде [14–16]. Показаны регуляторные эффекты H₂S в сердечно-сосудистой системе различных классов позвоночных животных (рыб, амфибий, рептилий), что указывает на филогенетическую древность H₂S как газомедиатора и универсальность его действия [17–20]. В исследованиях на целом сердце и изолированных кардиомиоцитах крысы было показано, что H₂S оказывал отрицательный инотропный эффект [21–23] однако, сведения о механизмах его действия неоднозначны. Так, в сердце крысы изменение потенциала действия

The effect of sodium hydrosulfide (NaHS) — donor of hydrogen sulfide (H₂S) on the force of contraction of isolated mouse atrium was studied. Cumulative application of NaHS in concentrations 100, 200 and 300 μM induced dose-dependent decrease of the force of contraction, the maximum velocity of contraction and relaxation of the myocardium. A substrate of H₂S synthesis — L-cysteine in concentrations 1, 10, 50 μM also had the negative inotropic action, whereas a blocker of H₂S synthesis — β-cyano alanine caused an increase of the force of contraction. Inhibition of K-channels by tetraethylammonium (2 mM) caused the increase of the amplitude of contraction and the reduction of negative inotropic effect of NaHS in all used concentrations. After the inhibition of ATP-dependent K-channels by glibenclamide NaHS action was prevented in concentration 100 μM, significantly decreased in concentration 200 μM and didn't change in concentration 300 μM. Activation of ATP-dependent K-channels by diazoxide did not affect the negative inotropic effect of NaHS. The obtained data suppose that in the mouse atrium exogenous and endogenous H₂S causes a reduction of the force of contraction, which is mediated by the activation of ATP-dependent, calcium-activated or voltage-dependent K-channels.

Key words: hydrogen sulfide, ATP-dependent potassium channel, voltage-dependent potassium channels, calcium-activated potassium channels, L-cysteine

связывают с активацией АТФ-зависимых K-каналов (K(АТФ)-каналов) [24], уменьшение сократимости — с ингибированием β-адренорецепторов или Са-каналов [21, 24, 25].

Целью настоящей работы стало исследование эффектов экзогенного и эндогенного H₂S на сократимость миокарда предсердий мыши, а также выявление роли K-каналов различных типов в эффектах H₂S.

Материал и методы

Эксперименты по регистрации сократимости проводились на предсердиях мыши на установке Biopac Systems, Inc. (США). Исследование выполняли в соответствии с международными требованиями по работе с животными, утвержденными локальным этическим комитетом (КФУ, приказ №0.1.1.67-06/101/14 от 12.06.2014). Животное наркотизировали 5% изофлураном (Abbott Laboratories, США), быстро вскрывали грудную клетку и выделяли предсердия, подвешивали вертикально в ванночке объемом 20 мл. Снизу предсердие жестко фиксировали к блоку, верхний конец соединяли с тензометрическим датчиком (TSD125C, Biopac Systems, Inc., США) с диапазоном чувствительности 0–50 грамм.

e-mail: Guzel.Sitdikova@kpfu.ru

В течение эксперимента препарат омывался раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 154; KCl – 5; CaCl₂ – 2; MgSO₄ – 1, глюкоза – 11 (t = 20°C, pH 7,2–7,4). Раствор Кребса перфузировали карбогеном в течение всего эксперимента. Препарат стимулировали электрическими импульсами через 2 платиновых электрода (с помощью стимулятора ЭСЛ-2 (Россия)) с частотой стимулов 0,1 Гц, амплитудой сигнала 40 мВ, продолжительность стимула 5 мс. После погружения препарата в резервуар следовал период приработки в течение 40–60 мин, в ходе которого мышечным волокнам постепенно придавалось оптимальное напряжение.

Запись кривой сокращения регистрировали на персональном компьютере при помощи программного обеспечения Elf (автор А.В. Захаров). Оценивали силу сокращения, а также максимальную скорость сокращения (МСС) и максимальную скорость расслабления (МСР) полоски миокарда. Статистический анализ проводили помощью стандартных методов, достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

В качестве донора H₂S использовали гидросульфид натрия (NaHS), так как в водном растворе он диссоциирует до Na²⁺ и HS⁻, затем HS⁻ связывается с H⁺ с образованием H₂S. В нейтральном растворе одна треть NaHS находится в виде газа H₂S, и оставшиеся две трети – в виде HS⁻ [27]. В экспериментах также использовали L-цистеин, β-циано-L-аланин, глибенкламид, диазоксид, тетраэтиламмоний (ТЭА). Вещества нерастворимые в воде растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Концентрация ДМСО

в используемых растворах не превышала 0,01%, в данной концентрации ДМСО в контрольных экспериментах не оказывал существенного влияния на силу сокращения миокарда. Все использованные вещества фирмы Sigma (США).

Результаты

Влияние донора, субстрата и блокатора синтеза H₂S на силу сокращения миокарда

Для исследования эффектов экзогенного H₂S использовали донор NaHS, который кумулятивно апплицировали на препарат предсердия мыши в концентрациях 100, 200 и 300 мкМ. Добавление NaHS приводило к доза-зависимому снижению силы сокращения миокарда на 15±3% (n = 14, p < 0,05), 41±6% (n = 14, p < 0,05) и 61±4% (n = 15, p < 0,05), соответственно, относительно контроля (рис. 1А). Эффект NaHS был обратим, после отмывки происходило восстановление амплитуды сокращения предсердия. Снижение амплитуды сокращений сопровождалось достоверным уменьшением МСС и МСР предсердий (табл.; рис. 1А). Таким образом, NaHS оказывал отрицательный инотропный эффект в предсердиях мыши.

L-цистеин является основным субстратом синтеза H₂S в тканях [28]. Для выявления возможности эндогенного синтеза H₂S использовали L-цистеин и блокатор фермента синтеза H₂S. Добавление L-цистеина в концентрациях 1, 10, 50 мкМ приводило к достоверному уменьшению силы сокращения до 95±1% (n = 8, p < 0,05), 89±1% (n = 8, p < 0,05), 87±2% (n = 8, p < 0,05), соответственно (рис. 1Б),

Влияние донора H₂S на максимальную скорость сокращения (МСС) и максимальную скорость расслабления (МСР) предсердия мыши

| Контроль (n = 6) | | NaHS 100 μM (n = 6) | | NaHS 200 μM (n = 6) | | NaHS 300 μM (n = 6) | |
|------------------|-----------|---------------------|-----------|---------------------|------------|---------------------|------------|
| МСС | МСР | МСС | МСР | МСС | МСР | МСС | МСР |
| 1,15±0,09 | 0,83±0,09 | 1,00±0,08 | 0,74±0,07 | 0,69±0,11* | 0,55±0,07* | 0,49±0,07* | 0,38±0,06* |

* – p < 0,05.

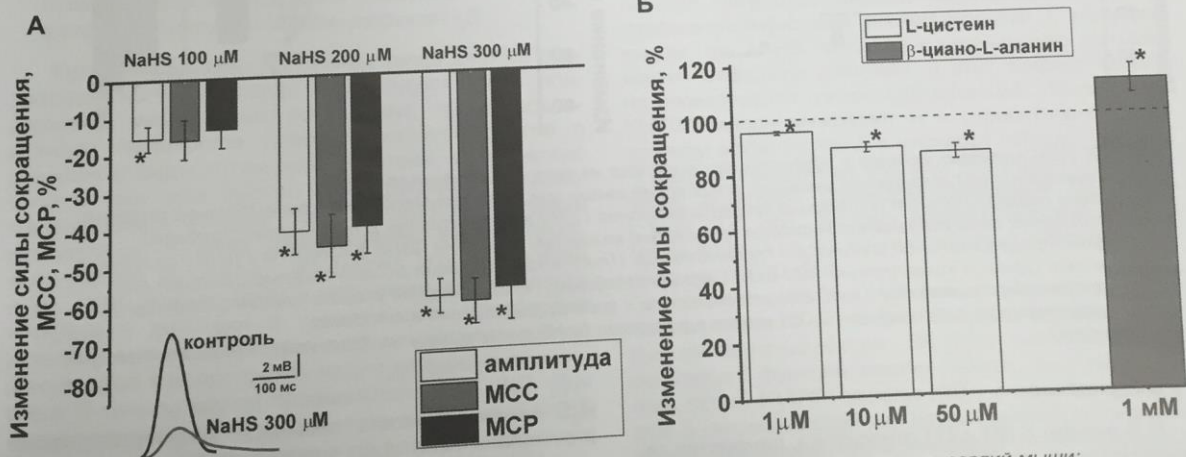


Рис. 1. Влияние экзогенного и эндогенного H₂S на сократительную функцию миокарда предсердий мыши: А – изменения силы сокращения, максимальной скорости сокращения (МСС) и максимальной скорости расслабления (МСР) при кумулятивной аппликации NaHS в концентрациях 100, 200 и 300 мкМ; на вкладке – оригинальная запись кривой сокращения миокарда предсердия мыши в контроле и при действии NaHS в концентрации 300 мкМ; Б – изменение силы сокращения миокарда предсердия мыши при действии субстрата синтеза H₂S L-цистеина в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ и блокатора цистатионин β-синтазы (ЦБС) – β-циано L-аланина в концентрации 1 мМ

тогда как использование более высокой концентрации L-цистеина – 2 мМ увеличивало силу сокращения до $121 \pm 4\%$ ($n = 3$, $p < 0,05$).

В сердечно-сосудистой системе H_2S синтезируется из L-цистеина ЦГЛ и 3-меркаптопируватсульфотрансферазой [19, 21, 25]. Для выявления возможности эндогенного синтеза газа был использован блокатор фермента синтеза H_2S ЦГЛ – β -циано-L-аланин. Апликация β -циано-L-аланина в концентрации 1 мМ приводила к достоверному повышению силы сократимости миокарда до 112 ± 5 ($n = 5$, $p < 0,05$) (рис. 1Б).

Таким образом, субстрат синтеза H_2S – L-цистеин вызывал снижение амплитуды сокращений миокарда аналогичное действию донора H_2S – NaHS, тогда как блокатор ЦГЛ вызывал противоположный эффект – повышение амплитуды сокращения.

Роль калиевых каналов различных типов в эффектах NaHS на амплитуду сокращений

Известно, что целый ряд K-токов участвует в реполяризации мембраны кардиомиоцитов в различные фазы потенциала действия [29]. В наших экспериментах неспецифический блокатор потенциал-зависимых и кальций-активируемых K-каналов TEA в концентрации 2 мМ приводил к увеличению силы сокращения полоски миокарда на $40 \pm 11\%$ ($n = 8$, $p < 0,05$). Апликация NaHS в концентрациях 100, 200 и 300 мкМ на фоне действия TEA приводила к снижению амплитуды сокращения на $3 \pm 1\%$

($n = 8$, $p > 0,05$), $18 \pm 6\%$ ($n = 8$, $p < 0,05$), $34 \pm 5\%$ ($n = 8$, $p < 0,05$) (рис. 2А), что достоверно меньше, чем эффект NaHS в контроле.

Известно, что K(ATФ)-каналы широко распространены в миокарде, и их активация является важным эндогенным механизмом кардиопротекции при ишемической реперфузии и гипоксии [21]. В качестве блокатора K(ATФ)-каналов использовался глибенкламид в концентрации 50 мкМ. После апликации глибенкламида происходило повышение силы сокращения на $21 \pm 5\%$ ($n = 6$, $p < 0,05$) (см. рис. 2А) от начального уровня. На фоне действия глибенкламида NaHS в концентрации 100 не приводил к изменению силы сокращения ($0,03 \pm 1\%$ ($n = 6$, $p > 0,05$)), в концентрациях 200 и 300 мкМ снижал силу сокращения на $17 \pm 2\%$ ($n = 7$, $p < 0,05$) и $52 \pm 5\%$ ($n = 7$, $p < 0,05$), соответственно. При этом достоверные отличия от эффекта NaHS в контроле получены для концентрации 100 и 200 мкМ.

Апликация диазоксид, активатора K(ATФ)-каналов, в концентрации 100 мкМ не приводила к достоверному снижению силы сокращения ($n = 7$, $p > 0,05$) (рис. 2Б). На фоне действия диазоксид эффект NaHS полностью сохранялся, в концентрации 100 мкМ происходило снижение амплитуды сокращения на $18 \pm 4\%$ ($n = 7$, $p < 0,05$), а в концентрациях 200 и 300 мкМ – на $49 \pm 10\%$ ($n = 7$, $p < 0,05$) и $67 \pm 8\%$ ($n = 7$, $p < 0,05$), соответственно, что не отличается от эффекта NaHS в контроле (рис. 2Б).

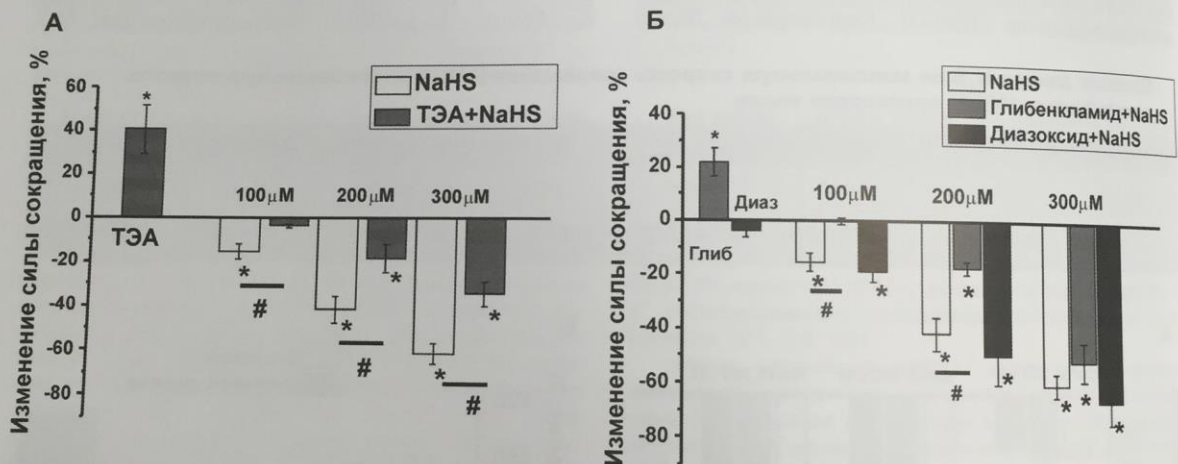


Рис. 2. Роль калиевых каналов в эффектах сероводорода на силу сокращения миокарда:

А – изменение силы сокращения миокарда предсердий мыши при действии NaHS в контроле (белые столбики) и на фоне предварительной апликации тетраэтиламмония (ТЭА) в концентрации 2 мМ (серые столбики);
 Б – Изменение силы сокращения миокарда предсердий мыши при действии NaHS в контроле (белые столбики) и на фоне предварительной апликации глибенкламида (Глиб) в концентрации 50 мкМ (серые столбики) или диазоксид (Диаз) в концентрации 100 мкМ (черные столбики). По оси абсцисс указана концентрация NaHS.
 * – достоверность различий ($p < 0,05$) по отношению к уровню сокращения в контроле;
 # – достоверность различий ($p < 0,05$) между эффектами NaHS в контроле и на фоне действия различных соединений

Обсуждение

H_2S вместе с NO и CO относится к семейству газомедиаторов, участвующих в регуляции функций сердечно-сосудистой системы в физиологических и патофизиологических условиях. Показано влияние H_2S на сосудистый тонус, сократимость миокарда, а также его кардиопротекторное действие [19]. В настоящей работе продемонстрированы эффекты

H_2S на сократимость миокарда предсердий мыши и выявлены некоторые механизмы его действия.

Отрицательный инотропный эффект экзогенного и эндогенного H_2S

В нашем исследовании было показано, что экзогенный донор сероводорода NaHS оказывал дозозависимое снижение силы сокращения миокарда

предсердий мыши, которое достигало 50% при использовании максимальной концентрации 300 мкМ. Отрицательный инотропный эффект H_2S был также показан на целом сердце и кардиомиоцитах крысы [21, 22, 26], а также на целом сердце и полосках миокарда лягушки [18, 20, 23]. Надо отметить, что одновременно с отрицательным инотропным эффектом происходило снижение временных параметров сокращения — максимальной скорости нарастания и расслабления, что указывает на участие механизмов, регулирующих внутриклеточную концентрацию кальция в цитоплазме.

Несмотря на то, что имеющиеся анти-тела к ЦГЛ не выявили фермент в тканях сердца крысы и мыши, недавно было показана экспрессия мРНК ЦГЛ в миокарде мыши, а ингибитор ЦГЛ — DL-пропаргилглицин ингибировал продукцию H_2S примерно на 80% [16]. По-видимому, именно ЦГЛ определяет основную часть эндогенно синтезируемого H_2S . Наши данные, полученные с использованием субстрата синтеза H_2S и блокатора ЦГЛ, также указывают на возможность эндогенного синтеза H_2S в миокарде предсердия мыши. Так L-цистеин в низких микромолярных концентрациях вызывал снижение амплитуды сокращений аналогичное действию донора H_2S — NaHS, тогда как блокатор ЦГЛ вызывал противоположный эффект — повышение амплитуды сокращения (см. рис. 1Б). Интересно, что использование более высокой концентрации L-цистеина (2 мМ) приводило к увеличению силы сокращения, возможно, вследствие собственного влияния данной аминокислоты или блокирования ферментов синтеза H_2S по механизму фермент-субстратного ингибирования. Физиологические концентрации цистеина в плазме составляют около 20 мкМ [30], поэтому можно считать, что в используемых нами концентрациях эффект цистеина связан с продукцией H_2S . Наши результаты предполагают возможность эндогенного синтеза H_2S в миокарде мыши, регулирующей инотропную функцию сердца, как и у других позвоночных животных, ферментом ЦГЛ

Роль калиевых каналов различных типов в отрицательном инотропном эффекте H_2S

Калиевые каналы различных типов широко распространены в миокарде и участвуют как в поддержании мембранного потенциала, так и реполяризации потенциала действия кардиомиоцитов в различные фазы потенциала действия. К ним можно отнести два типа быстро активирующихся и инактивирующихся K-токов ($I_{to,f}$ и $I_{to,s}$) и несколько компонентов K-токов задержанного выпрямления, включающих I_{Kr} (rapid), I_{Ks} (slow), I_{Kur} (ultrarapid) и др. [29]. Кроме того, в регуляции длительности потенциала действия и сократимости предсердий миокарда мыши могут принимать участие и недавно выявленные в предсердиях мыши кальций-активируемые K-каналы малой проводимости [31, 32]. Для выявления роли калиевых каналов в эффектах NaHS использовали неспецифический блокатор калиевых каналов различных типов ТЗА. Применение ТЗА вызывало значительное повышение силы сокращения миокарда предсердий мыши, что связано с замедлением реполяризации потенциала действия и усилением входящего Ca-тока. В этих условиях эффект H_2S был достоверно ниже, чем в контрольных условиях. Можно предположить, что активация потенциал-

зависимых или Ca-активируемых K-каналов при действии H_2S будет приводить к ускорению реполяризации и, как следствие, к уменьшению входящего Ca-тока, тем более, что имеются данные об активирующем влиянии NaHS на K-каналы в различных возбудимых клетках [33, 34].

K(ATФ)-каналы, обнаруженные у млекопитающих в кардиомиоцитах [35], модулируются внутриклеточной концентрацией АТФ и ингибируются глибенкламидом. Активация каналов происходит при снижении уровня АТФ в клетке, что ведет к гиперполяризации мембраны и снижению возбудимости, например, в условиях гипоксии или ишемии [36]. Показано, что в гладкомышечных клетках H_2S напрямую активирует K(ATФ)-каналы, что лежит в основе их релаксации [37]. В наших экспериментах ингибирование K(ATФ)-каналов глибенкламидом приводило к увеличению силы сокращения, что вероятно связано с тоническим участием K(ATФ)-каналов в поддержании мембранного потенциала и реполяризации кардиомиоцитов [29]. В этих условиях отрицательный инотропный эффект NaHS не проявлялся в концентрации 100 мкМ, снижался примерно на 50% в концентрации 200 мкМ, тогда как эффект более высоких концентраций сохранялся. По-видимому, это свидетельствует о наличии и других мишеней действия газа, о чем говорит и сохранение эффекта H_2S в условиях активации K(ATФ)-каналов диазоксидом. Интересно, что в миокарде лягушки нами было также обнаружено предотвращение эффекта H_2S глибенкламидом, тогда как эффект газа сохранялся при активации K(ATФ)-каналов миноксидилом [18].

Активация K(ATФ)-каналов при действии H_2S будет приводить к укорочению потенциала действия кардиомиоцитов, снижению Ca-тока и уменьшению силы сокращения. Открытие каналов также приведет к гиперполяризации клетки и снижению ее возбудимости. Указанные механизмы лежат в основе кардиопотекторного действия во время метаболического стресса, так как сохраняют АТФ, используемую во время механического сокращения. В предсердиях данный механизм будет снижать и частоту сердечных сокращений, что также направлено на сохранение энергии. Полученные данные подтверждаются и электрофизиологическими исследованиями в миокарде крысы, где NaHS приводил к уменьшению длительности потенциала действия, и этот эффект частично блокировался глибенкламидом [24]. Кроме того, K(ATФ)-каналы участвуют и в отрицательном инотропном эффекте NaHS в миокарде лягушки [18, 23]. Другие возможные мишени действия H_2S в миокарде включают потенциал-зависимые Ca-каналы L-типа [22, 26], систему аденилатциклазы [25], а также возможно его взаимодействие с системой оксида азота [20, 23].

В основе действия H_2S лежит химическая модификация белков — процесс S-сульфгидрации, который путем превращения -SH групп цистеина в -SSH регулирует функции многих белков, включая тубулин, актин, K(ATФ)-каналы [38], сходный с процессом S-нитрозилирования, осуществляемого оксидом азота. Оказалось, что в миокарде NaHS усиливает процессы S-сульфгидрации цитозольных и мембранных белков [23], включая фосфоламбан, ключевой регулятор сокращения и расслабления, модулирующий захват ионов Ca в саркоплазматический ретикулум с помощью Ca-АТФазы (SERCA) [39]. Недавно было показано, что эндогенный H_2S оказывает вклад

в инактивацию SERCA путем дефосфорилирования фосфоламбана [40]. В результате происходит нарушение поглощения Ca в саркоплазматический ретикулум, что может являться в основе замедления релаксации, обнаруженной в нашем исследовании при действии H₂S.

Таким образом, в результате нашего исследования было выявлено, что в миокарде предсердий мыши экзогенный и эндогенный H₂S оказывает отрицательный инотропный эффект и замедляет скорость укорочения и расслабления миокарда. Выявлено, что мишенями H₂S газа являются АТФ-зависимые, Са-активируемые или потенциал-зависимые К-каналы.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Gerasimova E.V., Sitdikova G.F., Zefirov A.L. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator of mediator release in the frog neuromuscular synapse. *Neurochem. J.* 2008; 2(1-2): 120–6.
2. Sitdikova G.F., Gerasimova E.V., Khaertdinov N.N. et al. Role of cyclic nucleotides in effects of hydrogen sulfide on the mediator release in frog neuromuscular junction. *Neurochem. J.* 2009; 3(4): 282–7.
3. Ситдикова Г.Ф., Зефиоров А.Л. Сероводород: от канализаций Парижа к сигнальной молекуле. *Природа* 2010; 9: 29–37.
4. Ситдикова Г.Ф., Яковлев, Одношвикина Ю.Г. и др. Влияние сероводорода на процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки. *Нейрохимия* 2011; 28(4): 1–7.
5. Wang R. Physiological Implications of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration. *Thromb. Haemostasis. Physiol. Rev.* 2012; 92: 791–896.
6. Mitrukina O.B., Yakovlev A.V., Sitdikova G.F. The Effects of Hydrogen Sulfide on the Processes of Exo and Endocytosis of Synaptic Vesicles in the Mouse Motor Nerve Endings. *Biochem. Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology* 2013; 7(2): 170–3.
7. Герасимова Е.В., Яковлева О.В., Зефиоров А.Л. и др. Роль риадиноновых рецепторов в эффектах сероводорода на освобождение медиатора из двигательного нервного окончания лягушки. *Бюл. экпер. биол. и мед.* 2013; 155(1): 14–7.
8. Шафигуллин М.У., Зефиоров Р.А., Сабируллина Г.И. и др. Эффекты донора сероводорода на спонтанную сократительную активность желудка и тощей кишки крысы. *Бюл. экпер. биол. и мед.* 2014; 157(3): 275–280.
9. Sitdikova G.F., Islamov R.R., Mukhamedyarov M.A. et al. Modulation of neurotransmitter release by carbon monoxide at the frog neuro-muscular junction. *Curr Drug Metab.* 2007; 8(2): 177–84.
10. Abramochkin D.V., Khaertdinov N.N., Porokhnyia M.V. et al. Carbon monoxide affects electrical and contractile activity of rat myocardium. *J. Biomedical Sci.* 2011; 18(1): 18–40.
11. Hermann, A., Sitdikova G.F., Weiger T.M. Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology. Springer Press, Heidelberg. 2012; 204.
12. Yakovleva O.V., Shafigullin M.U., Sitdikova G.F. The Role of Nitric Oxide in the Regulation of Neurotransmitter Release and Processes of Exo- and Endocytosis of Synaptic Vesicles in Mouse Motor Nerve Endings. *Neurochem. J.* 2013; 7(2): 103–10.
13. Wang R. Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochem. Sci.* 2014; 39(5): 227–32.
14. 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: 527–31.
15. Yang G., Wu L., Jiang B. et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 2008; 322: 587–90.
16. Fu M., Zhang W., Yang G. et al. Is cystathionine gamma-lyase protein expressed in the heart? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 428(4): 469–74.
17. Dombkowski R.A., Russell M.J., Schulman A.A., et al. Vertebrate phylogeny of hydrogen sulfide vasoactivity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005; 288: R243–R252.
18. Sitdikova G.F., Khaertdinov N.N., Zefirov A.L. Role of calcium and potassium channels in effects of hydrogen sulfide on frog myocardial contractility. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011; 151: 163–6.
19. Liu Y.H., Lu M., Hu L.F. et al. Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system. *Antioxid. Redox Signal.* 2012; 17: 141–85.
20. Khaertdinov N.N., Ahmetshina D.R., Zefirov A.L. et al. Hydrogen Sulfide in Regulation of Frog Myocardium Contractility. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology* 2013; 7(1): 52–7.
21. Geng B., Yang J., Qi Y. et al. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 313: 362–8.
22. Sun Y., Cao Y., Wang W. et al. Hydrogen sulfide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 2008; 79(4): 632–41.
23. Mazza R., Pasqua T., Cerra M.C. et al. Akt/eNOS signaling and PLN S-sulfhydration are involved in H₂S-dependent cardiac effects in frog and rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013; 305: R443–R451.
24. Абрамочкин Д.В., Моисеев Л.С., Кузьмин В.С. Влияние сероводорода на электрическую активность предсердного миокарда крысы. *Бюл. экпер. биол. и мед.* 2009; 147(VI): 617–21.
25. Yong Q.C., Pan T.T., Hu L.F. et al. Negative regulation of beta-adrenergic function by hydrogen sulphide in the rat hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2008; 44(4): 701–10.
26. Zhang R., Sun Y., Tsai H. et al. Hydrogen Sulfide Inhibits L-Type Calcium Currents Depending upon the Protein Sulfhydryl State in Rat Cardiomyocytes. *PLoS ONE* 2012; 7(5): 1–11.
27. Beauchamp R.O., Bus J.S., Popp J.A. et al. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Critical Rev. in Tox.* 1984; 13: 25–97.
28. Maclean K.N., Kraus E., Kraus J.P. The dominant role of Spl in regulating the cystathionine p-synthase-1a and -1b promoters facilitates potential tissue-specific regulation by Kruppel-like factors. *Biol. Chem.* 2004; 279: 8558–66.
29. Nerbonne J.M., Kass R.S. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol. Rev.* 2005; 85: 1205–53.
30. Richie J.P.Jr., Lang C.A. The determination of glutathione, cyst(e)line, and other thiols and disulfides in biological samples using high-performance liquid chromatography with dual electrochemical detection. *Ann. Biochem.* 1987; 163: 9–15.
31. Xu Y., Tuteja D., Zhang Z. et al., Molecular Identification and Functional Roles of a Ca²⁺-activated K-Channel in Human and Mouse Hearts. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(49): 49085–94.
32. Mu Y.H., Zhao W.C., Duan P. et al. RyR2 modulates a Ca²⁺-activated K⁺ current in mouse cardiac myocytes. *PLoS One* 2014; 9(4): e94905.
33. Sitdikova G.F., Weiger T.M., Hermann A. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium 5 (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* 2010; 459: 389–97.
34. Martellia A., Testaia L., Breschia M.C. et al. Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels. *Pharmacol. Res.* 2013; 70: 27–34.
35. Noma A. ATP-regulated potassium channels in the heart. *Nature* 1983; 305: 147–8.
36. Gross G.J., Fryer R.M. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K-channels and myocardial preconditioning. *Circ. Res.* 1999; 84: 973–9.
37. Zhao W., Zhang J., Lu Y. et al. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP)-channel opener. *EMBO J.* 2001; 20: 6008–16.
38. Mustafa A.K., Sikka G., Gazi S.K., et al. Snyder S.H. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ. Res.* 2011; 109: 1259–68.
39. Cerra M.C., Imbrogno S. Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. *Acta Physiol. (Oxf.)* 2012; 205: 9–25.
40. Chen Y., Zhao J., Du J. et al. Hydrogen sulfide regulates cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake via K(ATP)-channel and PI3K/Akt pathway. *Life Sci.* 2012; 91: 271–8.

Поступила: 18.08.2014