

УДК 612.17

СЕРОВОДОРОД В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИМОСТИ МИОКАРДА ЛЯГУШКИ

© 2012 г. Н. Н. Хаертдинов¹, Д. Р. Ахметшина¹, А. Л. Зефирова², Г. Ф. Ситдикова^{1*}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18;

*электронная почта: Guzel.Sitdikova@ksu.ru

²Казанский государственный медицинский университет Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 420012 Казань, ул. Бутлерова, д.42

Поступила в редакцию 25.06.2011 г.

После доработки 19.10.2011 г.

Сероводород (H_2S) наряду с оксидом азота (NO) и монооксидом углерода (CO) относится к эндогенно синтезируемым газообразным молекулам. Он оказывает целый ряд эффектов в сердечно-сосудистой системе как в норме, так и при различных патологических состояниях. С помощью метода тензометрии исследовали влияние и механизмы действия донора H_2S – гидросульфида натрия (NaHS) – на сократимость миокарда лягушки. NaHS в концентрации 100 мкМ оказывал отрицательный инотропный эффект, уменьшая максимальную скорость укорочения и расслабления полоски. Аналогичное действие оказывал субстрат эндогенного синтеза H_2S – *L*-цистеин (200 и 1000 мкМ), тогда как блокаторы цистатионин- γ -лиазы, вовлеченной в синтез H_2S , – β -цианаланин (500 мкМ) и пропаргилглицин (500 мкМ) усиливали сократимость миокарда. В условиях блокирования цистатионин- γ -лиазы β -цианаланином отрицательный инотропный эффект *L*-цистеина не проявлялся. При ингибировании аденилатциклазы MDL-12,330A (3 мкМ) и фосфодиэстеразы IBMX (200 мкМ) эффект NaHS был менее выражен, чем в контроле. На фоне действия проникающих через мембрану аналогов сAMP – 8Br-cAMP (100 мкМ) и pCPT-cAMP (100 мкМ) отрицательный инотропный эффект NaHS сохранялся полностью. Предварительная аппликация донора NO – SNAP (10 мкМ) – значительно снижала выраженность эффекта NaHS, тогда как в условиях блокирования NO-синтазы (LNAME, 100 мкМ) влияние NaHS на сократимость миокарда не изменялось. Полученные данные предполагают возможность эндогенного синтеза H_2S в миокарде лягушки и регуляцию сократимости миокарда через активность фосфодиэстеразы, гидролизующих сAMP, что приводит к снижению активности сAMP-зависимых протеинкиназ и фосфорилирования потенциал-зависимых Са-каналов L-типа. В результате уменьшается вход ионов Са в кардиомиоциты и снижается сила сокращения миокарда.

Ключевые слова: сероводород, сократимость миокарда, аденилатциклаза, оксид азота.

Сероводород (H_2S) давно известен как токсичный газ [1], однако все больше данных свидетельствует о том, что H_2S синтезируется эндогенно и оказывает различные физиологические эффекты в сердечно-сосудистой и нервной системах, а также в желудочно-кишечном тракте [2–7]. Предполагается, что H_2S является эндогенным “газомедиатором”, как и два других физиологически активных газа – оксид азота (NO) и монооксид углерода (CO) [8, 9]. В сердечно-сосудистой системе H_2S синтезируется из *L*-цистеина цистатионин- γ -лиазой и 3-меркаптосульфотрансферазой [5, 10, 11], где влияет на вазодилатацию, регуляцию пролиферации и апоптоза, ангиогенез. Кроме этого, H_2S оказывает кардиопротекторное действие при повреждениях, связанных с ишемией–реперфузией [5, 10, 12]. Интересно, что H_2S влияет на сосудистый тонус позвоночных всех классов (рыб, амфибий, рептилий), включая вазоконстрикцию и вазодилатацию, что указывает

на филогенетическую древность H_2S как газомедиатора и универсальность его действия [13, 14].

На целом сердце и изолированных кардиомиоцитах крысы показано, что H_2S уменьшает длительность потенциала действия и оказывает отрицательный инотропный эффект [10, 15, 16]. Механизмы действия H_2S в миокарде млекопитающих включают, по разным данным и в зависимости от вида животного, систему аденилатциклазы, АТР-зависимые К-каналы и потенциал-зависимые Са-каналы L-типа [11, 15–17]. Регуляция синтеза сAMP при воздействии H_2S может играть важную кардиопротекторную роль, тем более что отмечено значительное снижение продукции H_2S в различных моделях ишемии и сверхстимуляции β -адренорецепторов [10, 12]. В миокарде лягушки донор сероводорода NaHS оказывал дозозависимый отрицательный инотропный эффект [18], однако механизмы действия H_2S не выявлены.

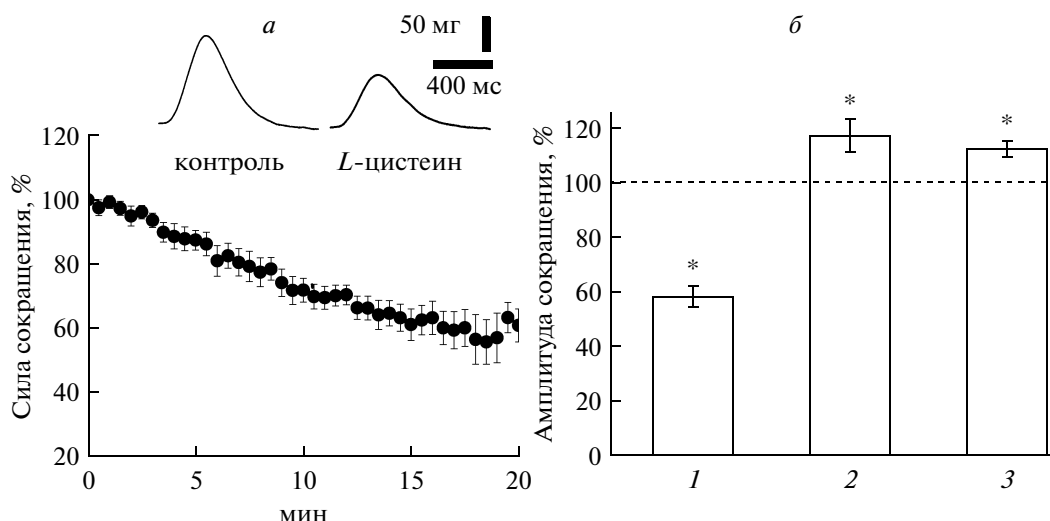


Рис. 1. Влияние субстрата и блокаторов синтеза сероводорода на сократимость миокарда. *a* – Динамика изменения силы сокращения при действии субстрата синтеза H_2S L-цистеина в концентрации 1 мМ. Вверху показаны оригинальные записи сокращений в контроле и при действии L-цистеина к 20 мин аппликации. *б* – Изменение силы сокращения миокарда при действии 1 мМ L-цистеина (1) и блокаторов цистатионин- γ -лиазы – 500 мкМ β -цианаланина (2) и 500 мкМ пропаргилглицина (3). * $p < 0.05$

Цель настоящей работы состояла в исследовании эффектов экзогенного и эндогенного H_2S на сократимость миокарда лягушки и выявление возможных молекулярных механизмов его действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты по регистрации сократимости проводили на полосках миокарда лягушки с помощью установки PowerLab с изометрического тензодатчика чувствительностью 0–50 г. (AD Instrument, Австралия, и Вiorac, США). Полоску желудочкового миокарда длиной 4–6 мм и диаметром 1 мм вертикально погружали в резервуар с рабочим объемом 20 мл и перфузировали раствором Рингера для холоднокровных животных, содержащим (мМ): 118.0 NaCl, 2.5 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 10 Trizma (pH 7.3–7.4, 20°C). Препарат стимулировали электрическими импульсами с частотой 0.1 Гц через два серебряных электрода. Сигналы обрабатывали с помощью программы Chart, силу сокращения определяли в граммах. Оценивали амплитуду сокращения, а также максимальные скорости укорочения и расслабления. Статистический анализ проводили с помощью стандартных методов, статистическую значимость различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

В качестве донора H_2S использовали гидросульфид натрия (NaHS), который в водном растворе диссоциирует на Na^{2+} и HS^- , затем HS^- связывается с H^+ с образованием H_2S . В нейтральном растворе одна треть NaHS находится в виде газа H_2S , а две трети – в виде HS^- [1]. В экспериментах

использовали также L-цистеин, β -цианаланин, пропаргилглицин, IBMX (3-изобутил-1-метилксантин), 8Br-cAMP, pCPT-cAMP (натриевая соль 8-(4-хлорфенилтио)аденозин-3',5'-аденозинциклофосфата), MDL-12.330A (гидрохлорид *цис*-N-(2-фенилциклопентил)-азациклотридец-1-ен-2-амин), LNAME (метилловый эфир N^G -нитро-L-аргинина), SNAP (S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин). Вещества, нерастворимые в воде, растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO). Концентрация DMSO в используемых растворах не превышала 0.01%. В такой концентрации DMSO в контрольных экспериментах не влиял существенно на силу сокращения миокарда. Все использованные вещества были фирмы Sigma (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние донора, субстрата и блокаторов синтеза H_2S на силу сокращения миокарда. NaHS, донор H_2S , в концентрации 100 мкМ вызывал обратимое снижение амплитуды сокращения полоски желудочка сердца лягушки до $66 \pm 6\%$ ($n = 14$, $p < 0.05$) к 20 мин аппликации, что согласуется с ранее полученными данными [18]. При этом NaHS уменьшал максимальные скорости укорочения и расслабления полоски миокарда до 57 ± 8 и $53 \pm 7\%$ ($n = 5$, $p < 0.05$) по отношению к контролю соответственно. Субстрат синтеза H_2S – L-цистеин – в концентрации 200 мкМ вызывал, подобно донору газа, снижение амплитуды сокращения полоски миокарда до $83 \pm 6\%$ ($n = 6$, $p < 0.05$), а в концентрации 1 мМ – до $58 \pm 4\%$ ($n = 7$, $p < 0.05$) к 20 мин аппликации (рис. 1а, б).

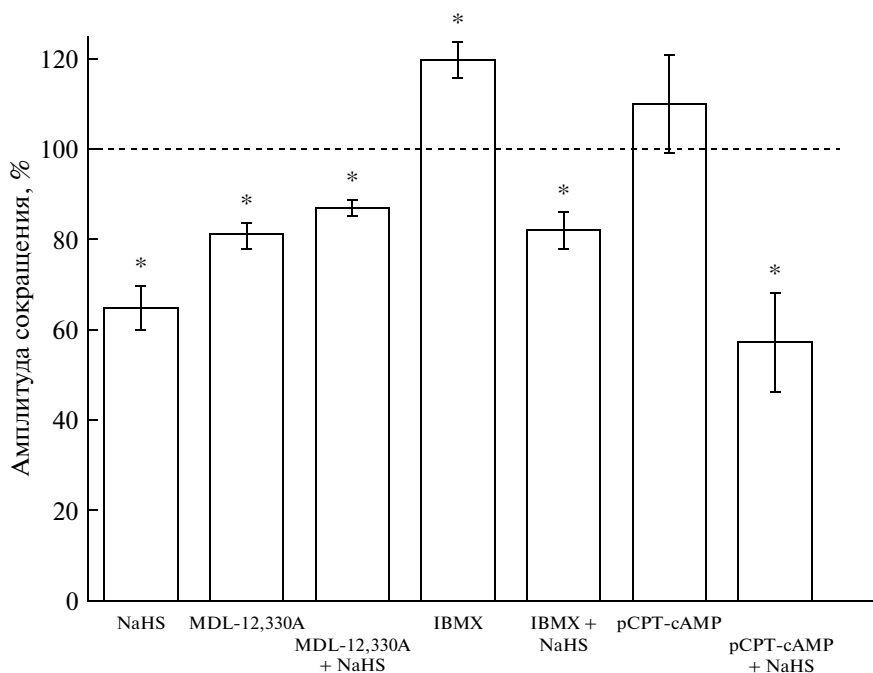


Рис. 2. Влияние гидросульфида натрия в условиях понижения и повышения уровня циклических нуклеотидов. Представлены амплитуды сокращения миокарда при действии NaHS (100 мкМ) в контроле, MDL-12,330A (3 мкМ), IBMX (200 мкМ), pCPT-cAMP (100 мкМ) и NaHS на фоне действия указанных агентов. При анализе эффектов NaHS за 100% принимались значения, полученные на фоне действия MDL-12,330A, IBMX, pCPT-cAMP соответственно. * $p < 0.05$

Для выявления возможности эндогенного синтеза газа использовали блокаторы цистатинин- γ -лиазы β -цианаланин и пропаргилглицин в концентрации 500 мкМ. β -Цианаланин повышал силу сократимости миокарда до $117 \pm 6\%$ ($n = 8$, $p < 0.05$), а пропаргилглицин – до $112 \pm 3\%$ ($n = 8$, $p < 0.05$) к 15 мин аппликации (рис. 1б). Таким образом, эндогенно синтезируемый H_2S вызывал такие же эффекты, как и апплицируемый экзогенно, а блокаторы цистатинин- γ -лиазы оказывали противоположное действие. В условиях блокирования цистатинин- γ -лиазы β -цианаланином аппликация *L*-цистеина (200 мкМ или 1 мМ) не приводила к снижению амплитуды сокращения.

Аденилатциклазная система и эффекты H_2S в миокарде. В нервной системе и кардиомиоцитах теплокровных животных эффекты H_2S могут опосредоваться изменением уровня cAMP [11, 19], поэтому изучали влияние газа в условиях повышения и понижения уровня этого циклонуклеотида. Ингибирование аденилатциклазы с помощью MDL-12.330A (3 мкМ) приводило к снижению силы сокращения до $81 \pm 3\%$ ($n = 11$, $p < 0.05$) к 25–30 мин аппликации (рис. 2), что, по-видимому, связано с уменьшением концентрации cAMP в кардиомиоцитах. На фоне действия блокатора аденилатциклазы эффект H_2S был выражен в меньшей степени, чем в контроле, и составил $87 \pm 2\%$ ($n = 13$, $p < 0.05$) (рис. 2).

Для увеличения концентрации cAMP использовали проникающие через мембрану аналоги – 8Br-cAMP и pCPT-cAMP в концентрации 100 мкМ. Аппликация 8Br-cAMP или pCPT-cAMP не вызывала статистически значимых изменений амплитуды сокращения. К 20 мин действия pCPT-cAMP сила сокращения полоски миокарда составила $110 \pm 11\%$ ($n = 5$, $p > 0.05$), а 8Br-cAMP – $101 \pm 5\%$ ($n = 5$, $p > 0.05$) по отношению к контрольным значениям. Добавление NaHS на фоне 8Br-cAMP снижала сократимость полоски до $70 \pm 6\%$ ($n = 5$, $p < 0.05$) и до $57 \pm 11\%$ ($n = 5$, $p < 0.05$) в случае pCPT-cAMP (рис. 2). Таким образом, эффект NaHS на фоне действия аналогов cAMP сохранялся в той же степени, что и в контроле.

Другой способ увеличения уровня cAMP в клетке – ингибирование фосфодиэстераз. Мы использовали IBMX – неспецифический блокатор фосфодиэстераз циклических нуклеотидов в концентрации 200 мкМ. В этом случае наблюдалось увеличение силы сокращения до $120 \pm 4\%$ ($n = 7$, $p < 0.05$) к 8 мин аппликации, что, по-видимому, связано с накоплением cAMP в кардиомиоцитах (рис. 2). При повышении уровня эндогенных циклических нуклеотидов NaHS снижал силу сокращения полоски миокарда до $82 \pm 4\%$ ($n = 5$), и этот эффект был меньше, чем эффект донора H_2S в контроле ($p < 0.05$) (рис. 2).

Таким образом, эффект H_2S частично снимался в условиях ингибирования аденилатциклазы

или фосфодиэстераз, но сохранялся при воздействии аналогов сАМР.

Система оксида азота и эффекты сероводорода.

Известно, что NO является важным регулятором силы сокращения миокарда у лягушки [20]. Исходя из данных о взаимодействии систем газообразных посредников, мы проанализировали эффекты NaHS в условиях ингибирования синтеза NO и повышения его эндогенной концентрации. Применение LNAME, блокатора различных форм NO-синтаз (100 мкМ), приводило к небольшому повышению амплитуды сокращений. К 15 мин аппликации LNAME сила сокращения составила $115 \pm 4\%$ ($n = 7, p < 0.05$). При блокировании синтеза NO NaHS снижал силу сокращений миокарда до $65 \pm 8\%$ ($n = 7$), что не отличалось от эффекта H_2S в контроле. Таким образом, эффект H_2S не связан с изменением синтеза NO. Донор NO – SNAP – в концентрации 10 мкМ уменьшал сократимость миокарда до $86 \pm 5\%$ ($n = 10, p < 0.05$). На фоне действия SNAP отрицательный инотропный эффект NaHS был значительно менее выражен, чем в контроле, и составил $89 \pm 2\%$ ($n = 11, p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Отрицательный инотропный эффект экзогенного и эндогенного H_2S . Нами показано, что как экзогенный, так и эндогенно синтезируемый H_2S оказывают отрицательный инотропный эффект на миокард лягушки. Так, субстрат синтеза H_2S – L-цистеин – вызывал такое же снижение амплитуды сокращений миокарда, как и донор H_2S – NaHS, тогда как блокаторы цистатионин- γ -лиазы оказывали противоположное действие – повышали амплитуду сокращения. Известно, что в плазме млекопитающих L-цистеин содержится в микромолярных концентрациях, однако ферменты синтеза H_2S обладают низким сродством к цистеину, поэтому, чтобы повысить синтез H_2S , обычно используют значительные концентрации субстрата – 1 мМ и более [21–23]. В наших экспериментах снижение силы сокращения миокарда наблюдалось уже при использовании 200 мкМ субстрата и было ярко выражено при концентрации 1 мМ, что, по-видимому, связано с усилением синтеза H_2S . Кроме того, эффект L-цистеина не проявлялся при ингибировании цистатионин- γ -лиазы (рис. 1). Полученные данные указывают на возможность синтеза H_2S в миокарде холоднокровных животных цистатионин- γ -лиазой с использованием в качестве субстрата L-цистеина. Отрицательный инотропный эффект NaHS в миокарде наблюдали у теплокровных животных [10, 11, 16] и в наших работах, выполненных ранее на сердце лягушки [18]. Данные о концентрации газа в миокарде лягушки отсутствуют. Однако в сосудах низших позвоночных H_2S синтезируется

цистатионин- γ -лиазой в концентрациях, сравнимых с концентрацией H_2S в сосудах крысы. Концентрация H_2S в плазме форели равна примерно 40 мкМ, что выше, чем у млекопитающих [13, 14]. По-видимому, миокард лягушки, как и у позвоночных других классов, содержит систему синтеза H_2S , что предполагает его тоническое действие на миокард.

сАМР как фактор, опосредующий эффект H_2S на сократимость миокарда. Основной фактор, запускающий и определяющий силу сокращения миокарда – внутриклеточная концентрация ионов кальция. В ответ на деполаризацию мембраны кардиомиоцитов происходит открытие потенциал-зависимых Са-каналов L-типа и вход Ca^{2+} , который вызывает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных Са-депо через рианодиновые рецепторы и запускает процесс мышечного сокращения [24, 25]. В кардиомиоцитах желудочка лягушки вследствие слабого развития саркоплазматического ретикула основным источником кальция служит Ca^{2+} , входящий через Са-каналы плазматической мембраны [26]. В основе отрицательного инотропного эффекта NaHS может лежать уменьшение входа ионов кальция в кардиомиоциты. В наших предыдущих исследованиях эффект NaHS полностью сохранялся в условиях блокирования Са-каналов нифедипином [18], что указывает на отсутствие прямого ингибирующего действия газа на субъединицы Са-канала. Регуляция Са-тока может осуществляться посредством фосфорилирования сАМР-зависимыми киназами при повышении уровня сАМР в ответ на активацию β -адренорецепторов [27]. Известно, что в фосфорилированном состоянии Са-канал имеет большую проводимость и вероятность открытия и активируется при более негативных значениях мембранного потенциала [25].

В наших экспериментах как снижение, так и повышение эндогенного уровня сАМР уменьшало выраженность эффекта H_2S , что указывает на участие в этих эффектах аденилатциклазной системы (рис. 2). При этом блокирование аденилатциклазы снижало силу сокращения, тогда как увеличение эндогенного уровня сАМР с помощью IBMX, неспецифического блокатора фосфодиэстераз, усиливало ответ, что подтверждает участие сАМР-зависимых путей в регуляции сократимости. Однако использование проникающих через мембрану аналогов сАМР (pCPT-сАМР или 8Br-сАМР) не приводило к значительному изменению силы сокращения и не влияло на эффект NaHS (рис. 2). Используемые нами аналоги относительно устойчивые, хотя известно, что они подвергаются гидролизу Са/кальмодулин-зависимой, сGMP-ингибируемой и сGMP-стимулируемой фосфодиэстеразами [28], присутствующими в кардиомиоцитах лягушки. Кроме того, отсутствие эффекта pCPT-сАМР или 8Br-сАМР на си-

лу сокращения миокарда свидетельствует о том, что они не могут имитировать ситуацию, при которой повышается эндогенный уровень сАМР (как в случае с IBMX). Это может быть связано с тем, что аналоги сАМР активируют не только протеинкиназу А, но и протеинкиназу G [28, 29], ингибируют сGMP-специфичную фосфодиэстеразу, приводя к увеличению уровня сGMP [28, 30]. Активация протеинкиназы G, в свою очередь, будет приводить к снижению амплитуды Са-тока [31]. Кроме того, во влиянии сАМР на сократимость важную роль играет его локализация вблизи мишеней, а простого повышения общего уровня сАМР недостаточно для специфической регуляции белковой мишени [32]. В желудочковых кардиомиоцитах лягушки Са-ток регулируется локальным повышением уровня сАМР вблизи цитоплазматической мембраны. Фосфодиэстеразы обеспечивают компартиментализацию сАМР, предотвращая его диффузию вдоль кардиомиоцита. Расположение закоривающего белка протеинкиназы А вблизи Са-каналов обеспечивает локальный контроль Са-тока сАМР-зависимыми процессами [33].

Опубликованы данные, согласно которым аденилатциклаза может быть мишенью для NaHS. Так, в центральной нервной системе NaHS усиливал проводимость глутаматных NMDA-рецепторов и повышал уровень сАМР [19]. В кардиомиоцитах крысы H₂S снижал положительный инотропный эффект изопроterenолола за счет ингибирования синтеза сАМР [11]. Участие системы сАМР в эффектах H₂S отмечено и в двигательном нервном окончании лягушки, где эффект газа уменьшался при повышении уровня сАМР [34].

Роль оксида азота в эффектах H₂S. Полученные нами данные указывают на взаимодействие двух систем газообразных посредников — H₂S и NO. Так, на фоне предварительной аппликации донора NO — SNAP — эффект NaHS был выражен в меньшей степени, чем в контроле. При этом SNAP вызывал снижение амплитуды сокращения, что согласуется с известными данными [20]. Такое взаимодействие может осуществляться как на уровне регуляции активности ферментов, синтезирующих NO и H₂S, так и сигнальных путей, запускаемых этими газами. Так, в сосудистой ткани H₂S снижал активность NO-синтазы [35], а донор NO, нитропруссид натрия, усиливал экспрессию цистатионин-γ-лиазы и цистатионин-β-синтазы [36]. В наших исследованиях эффект NaHS полностью сохранялся в условиях ингибирования NO-синтазы неспецифическим блокатором LNAME, что указывает на отсутствие влияния NaHS на синтез NO. Взаимосвязь функции H₂S и NO показана в сосудистой ткани теплокровных животных, где нитропруссид натрия усиливал сосудорасширяющий эффект H₂S [37], а H₂S уменьшал расслабляющий эффект NO [38].

Отрицательный инотропный эффект NO в миокарде лягушки опосредуется увеличением уровня сGMP, мишенью которого является сGMP-зависимая фосфодиэстераза (фосфодиэстераза 2). Активация фосфодиэстеразы 2 ведет к понижению уровня сАМР, угнетению Са-тока и снижению силы сокращения [39]. Благодаря ко-локализации Са-каналов и фосфодиэстеразы 2, представленной у лягушки в основном в мембранной фракции, сильное снижение концентрации сАМР происходит только вблизи Са-каналов [40], что обеспечивает компартиментализацию сАМР и регулирует фосфорилирование Са-канала отдельно от других субстратов протеинкиназы А [39]. По-видимому, предварительная аппликация донора NO приводит к активации фосфодиэстеразы 2 и снижению уровня сАМР. В этих условиях эффект NaHS уменьшался, что еще раз указывает на возможное участие фосфодиэстераз в эффекте газа. Кроме того, нельзя исключить возможность химического взаимодействия между NO и H₂S с образованием нитрозотиолов, что будет влиять на концентрацию и эффекты обоих газов [41].

Таким образом, полученные нами данные указывают на возможность эндогенного синтеза H₂S цистатионин-γ-лиазой в миокарде лягушки. Как эндогенный, так и экзогенный H₂S обладают отрицательным инотропным эффектом. В основе действия H₂S лежит снижение уровня сАМР вследствие уменьшения его синтеза или усиления гидролиза. В результате снижается активность сАМР-зависимых протеинкиназ и фосфорилирование потенциал-зависимых Са-каналов L-типа, уменьшается вход Са в клетку и снижается сила сокращения миокарда. Этот эффект может играть важную роль в регуляции инотропной функции сердца во время активации β-адренорецепторов, вовлеченных в адренергическую регуляцию сократимости миокарда.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 12-04-00960) и программы поддержки Ведущих научных школ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beauchamp R.O., Jr., Bus J., Popp J., Boreiko C., Andjelkovich D. 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **13**, 25–97.
2. Ситдикова Г.Ф., Зефилов А.Л. 2006. Газообразные посредники в нервной системе. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* **97** (7), 872–882.
3. Ситдикова Г.Ф., Зефилов А.Л. 2010. Сероводород: от канализаций Парижа к сигнальной молекуле. *Природа.* **9**, 29–37.
4. Герасимова Е.В., Ситдикова Г.Ф., Зефилов А.Л. 2008. Сероводород как эндогенный модулятор освобождения медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки. *Нейрохимия.* **25** (1–2), 138–145.

5. Eley D., Fowkes R., Baxter G. 2010. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S) cell biochemistry and function. *Cell Biochem. Funct.* **28**, 95–106.
6. Kimura H. 2010. Hydrogen sulfide: from brain to gut antioxidant. *Redox Signal.* **12**, 1111–1123.
7. Sitdikova G., Weiger T., Hermann A. 2010. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pflugers Arch. – Eur J. Physiol.* **459**, 389–397.
8. Gadalla M., Snyder S. 2010. Hydrogen sulfide as gasotransmitter. *J. Neurochem.* **113**, 14–26.
9. Hermann A., Sitdikova G., Weiger T. 2010. Gase als zellulare Signalstoffe. *Biol. Unserer Zeit.* **40**, 185–193.
10. Geng B., Yang J., Qi Y., Zhao J., Pang Y., Du J., Tang C. 2004. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313** (2), 362–368.
11. Yong Q., Pan T., Hu L., Bian J. 2008. Negative regulation of β -adrenergic function by hydrogen sulfide in the rat hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.* **44** (4), 701–710.
12. Bian J., Yong Q., Pan T., Feng Z., Ali M., Zhou S., Moore P. 2006. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and Cardiac Myocytes. *J. Pharm. Exp. Ther.* **316** (2), 670–678.
13. Dombkowski R., Russell M., Olson K. 2004. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**, 678–685.
14. Olson K. 2005. Vascular actions of hydrogen sulfide in nonmammalian vertebrates. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 804–812.
15. Абрамочкин Д.В., Моисеенко Л.С., Кузьмин В. С. 2009. Влияние сероводорода на электрическую активность предсердного миокарда крысы. *Бюлл. экп. биол. мед.* **147** (6), 617–621.
16. Sun Y., Cao Y., Wang W., Ma S., Yao T., Zhu Y. 2008. Hydrogen sulfide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **79** (4), 632–641.
17. Xu M., Wu Y., Li Q., Wang F., He R. 2007. Electrophysiological effects of hydrogen sulfide on guinea pig papillary muscles *in vitro*. *Sheng Li Xue Bao.* **59** (2), 215–220.
18. Ситдикова Г.Ф., Хаертдинов Н.Н., Зефирова А.Л. 2011. Исследование роли кальциевых и калиевых каналов в эффектах сероводорода на сократимость миокарда лягушки. *Бюлл. экп. биол. мед.* **151** (2), 124–128.
19. Kimura H. 2000. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 129–133.
20. Chesnais J., Fischmeister R., Méry P. 1999. Positive and negative inotropic effects of NO donors in atrial and ventricular fibres of the frog heart. *J. Physiol.* **518**, 449–461.
21. Dominy J., Stipanuk M. 2004. New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: production of H₂S, a neuromodulator and smooth muscle relaxant. *Nutr. Rev.* **62** (9), 348–353.
22. Teague B., Asiedu S., Moore P. 2002. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide *in vitro*: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br. J. Pharmacol.* **137** (2), 139–145.
23. Cheng Y., Ndisang J., Tang G., Cao K., Wang R. 2004. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287** (5) H2316–2323.
24. Зефирова А.Л., Ситдикова Г.Ф. 2010. *Ионные каналы возбудимой клетки (структура, функция, патология)*. Казань: Арт-кафе, 271 с.
25. Kamp T., Hell J. 2000. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ. Res.* **87**, 1095–1102.
26. Tijssens P., Meissner G., Franzini-Armstrong C. 2003. Location of ryanodine and dihydropyridine receptors in frog myocardium. *Biophys. J.* **84**, 1079–1092.
27. Одношвикина Ю.Г., Петров А.М., Зефирова А.Л. 2011. Влияние активации β 2-адренорецепторов в предсердиях мышцы на силу сокращения, Ca-сигналы и продукцию оксида азота. *Acta Naturae.* **3** (1), 85–94.
28. Sandberg M., Butt E., Nolte C., Fischer L., Halbrügge M., Beltman J., Jahnsen T., Genieser H., Jastorff B., Walter U. 1991. Characterization of Sp-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole-3',5'-monophosphorothioate (Sp-5.6-DC1-cBiMPS) as a potent and specific activator of cyclic-AMP-dependent protein kinase in cell extracts and intact cells. *Biochem. J.* **279** (2), 521–527.
29. Sugita S., Baxter D., Byrne J. 1994. cAMP-independent effects of 8-(4-parachlorophenylthio)-cyclic AMP on spike duration and membrane currents in pleural sensory neurons of *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* **72** (3), 1250–1259.
30. Connolly B., Willits P., Warrington B., Murray K. 1992. 8-(4-Chlorophenylthio)-cyclic AMP is a potent inhibitor of the cyclic GMP-specific phosphodiesterase (PDE VA). *Biochem. Pharmacol.* **44** (12), 2303–2306.
31. Keef K., Hume J., Zhong J. 2001. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca²⁺ channels (Ca(V)1.2a,b) by protein kinases. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281** (6), 1743–1756.
32. Zaccolo M. 2009. cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. *Br. J. Pharmacol.* **158**, 50–60.
33. Jurevicius J., Skeberdis V., Fischmeister R. 2003. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in cAMP compartmentation following β 2-adrenergic stimulation of ICa,L in frog ventricular myocytes. *J. Physiol.* **551** (1), 239–252.
34. Ситдикова Г.Ф., Герасимова Е.В., Хаертдинов Н.Н., Зефирова А.Л. 2009. Роль циклических нуклеотидов в эффектах сероводорода на освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки. *Нейрохимия.* **26** (4), 1–7.
35. Kubo S., Doe I., Kurokawa Y., Nishikawa H., Kawabata A. 2007. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology.* **232**, 138–146.

36. Zhao W., Wang R. 2002. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, 474–480.
37. Hosoki R., Matsuki N., Kimura H. 1997. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 527–531.
38. Zhao W., Ndisang J., Wang R. 2003. Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**, 848–853.
39. Dittrich M., Jurevicius J., Georget M., Rochais F., Fleischmann B., Hescheler J., Fischmeister R. 2001. Local response of L-type Ca²⁺ current to nitric oxide in frog ventricular myocytes. *J. Physiol.* **534** (1), 109–121.
40. Lugnier C., Gauthier C., Le Bec A., Soustre H. 1992. Cyclic nucleotide phosphodiesterases from frog atrial fibers: isolation and drug sensitivities. *Am. J. Physiol.* **262**, 654–660.
41. Whiteman M., Li L., Kostetski I., Chu S., Siau J., Bhatia M., Moore P. 2006. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 303–310.

Hydrogen Sulfide in Regulation of Frog Myocardium Contractility

N. N. Khaertdinov¹, D. R. Ahmetshina¹, A. L. Zefirov², G. F. Sitdikova¹

¹Kazan Federal University, Kremlevskaya ul., 18, Kazan, 420008 Russia

²Kazan Medical University, ul. Butlerova, 42, Kazan, 420012 Russia

Hydrogen sulfide (H₂S) is an endogenously synthesized gaseous molecule which along with nitric oxide and carbon monoxide induces a number of effects in cardiovascular system in normal and pathological conditions. In the present study the effects and underlying mechanisms of H₂S donor, sodium hydrosulfide (NaHS), on isometric force of frog myocardium contraction were studied. NaHS in the concentration of 100 μM induced a negative inotropic effect and decreased the maximal velocity of contraction and relaxation of isolated ventricle strips. The substrate of H₂S synthesis L-cystein (200 μM and 1 mM) induced the same effect and the inhibitors of cystationin γ-lyase, H₂S-producing enzyme in heart, β-cyanoalanin (500 μM) and propargylglycine (500 μM) increased the amplitude of contraction. Inhibition of cystationin γ-lyase by β-cyanoalanin prevented the negative inotropic effect of L-cystein. After inhibition of adenylate cyclase by MDL-12,330A (3 μM) or phosphodiesterases by IBMX (200 μM) effect of NaHS was lesser than in control. In the presence of membrane-penetrating analogous of cAMP, 8Br-cAMP (100 μM) and pCPT-cAMP (100 μM), negative inotropic effect of NaHS completely retained. The effect of NaHS significantly decreased after preliminary application of the NO donor, SNAP (10 μM), and did not change after inhibition of NO-synthases by LNAME (100 μM). The obtained data suggest the possibility of endogenous synthesis of H₂S in frog myocardium and regulation of its contractility by activation of phosphodiesterases hydrolyzing cAMP, which leads to a decrease of activation of cAMP-dependent protein kinases and phosphorylation of voltage-dependent L-type Ca-channels. As the result, a reduction of calcium entry into cardiomyocytes decreases the contractility of frog myocardium.