

Н.А. Струтинська, О.М. Семенихіна, С.В. Чорна, Г. Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкривання мітохондріальної пори у серці дорослих і старих щурів

У досліджах *in vivo* та *in vitro* на мітохондріях, ізольованих із тканини серця дорослих і старих щурів, досліджували вплив донора сірководню – NaHS, а також субстрату його біосинтезу – L-цистеїну, на чутливість мітохондріальної пори (МП) до дії її природного індуктора Ca^{2+} . Встановлена концентраційна залежність впливу NaHS (10^{-12} – 10^{-4} моль/л) на набухання мітохондрій серця щурів. Показано, що у безкальцієвому середовищі за умов дії донора сірководню в межах концентрацій 10^{-12} – 10^{-8} моль/л відбувалося помірне набухання мітохондрій серця щурів. NaHS у концентрації 10^{-10} моль/л спричиняв набухання мітохондрій, зміна максимальної величини (Δ) якого становила 11 та 15 % у дорослих та старих щурів відповідно. Інгібітор мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів (K_{ATP} -каналів) 5-гідроксидекааноат (10^{-4} моль/л) зменшував набухання мітохондрій за наявності NaHS (10^{-10} моль/л), що може свідчити про внесок цих каналів у кальційнезалежну провідність мембран органел у серці. Донор сірководню у фізіологічних концентраціях 10^{-6} , 10^{-5} і $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л пригнічував кальційіндуковане відкривання МП, що свідчить про його протекторний щодо пороутворення вплив, який становив 31, 76 і 77 % відповідно у серці дорослих щурів. А у старих тварин такий ефект спостерігали тільки при концентрації NaHS 10^{-5} моль/л. Таким чином, донор сірководню в межах досліджуваних концентрацій моль/л спричиняв неоднозначну дію щодо відкривання МП: низькі концентрації (10^{-12} – 10^{-8} моль/л) збільшували набухання органел, а фізіологічні (10^{-6} – $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) – здійснювали протекторний ефект щодо кальційіндукованого набухання мітохондрій серця щурів. Преінкубація ізольованих мітохондрій з 5-гідроксидекааноатом (10^{-4} моль/л) зменшувала протекторний ефект NaHS (10^{-5} моль/л) відносно кальційіндукованого відкривання МП, що свідчить про можливе залучення мітохондріальних K_{ATP} -каналів у залежне від сірководню інгібування пороутворення у серці. В експериментах *in vivo* при одноразовому внутрішньоочеревинному введенні як NaHS (10^{-4} моль/кг), так і L-цистеїну (10^{-3} моль/кг) показано зменшення чутливості МП до індуктора Ca^{2+} у серці дорослих і старих щурів. L-цистеїн у порівнянні з NaHS виявився більш ефективним щодо попередження кальційіндукованого відкривання МП: спостерігали збільшення на порядок концентрації Ca^{2+} , яка спричиняла набухання мітохондрій у серці тварин. У досліджах *in vivo* при використанні специфічного блокатора фермента цистатіонін- γ -ліази – пропаргілгліцину (10^{-4} моль/кг), який бере участь у біосинтезі сірководню, спостерігали значне підвищення чутливості МП до індуктора Ca^{2+} внаслідок зменшення на два порядки порогової його концентрації, яка спричиняє набухання органел. Отже, показана причетність ендogenousого сірководню до регуляції пороутворення у серці. Таким чином, результати досліджень свідчать про участь сірководню у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран, що може бути важливим регуляторним фактором у розвитку серцево-судинних захворювань.

Ключові слова: сірководень, L-цистеїн, мітохондріальна пора, серце, старіння, щури.

ВСТУП

Сірководень (H_2S) є біологічно активним газовим медіатором, який, поряд з оксидом

азоту (NO) та монооксидом вуглецю (CO), здійснює регулювання низки важливих фізіологічних функцій в організмі, у тому числі модуляторний контроль над функція-

© Н.А. Струтинська, О.М. Семенихіна, С.В. Чорна, Г. Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

ми клітини та їх органелами, такими, як мітохондрії [16, 18].

Подібно до NO і CO, H_2S є ліпофільною молекулою, що вільно проникає через плазматичну мембрану клітини. У концентрації 20–80 мкмоль/л його виявляють у сироватці крові і у більшості тканинах організму. Фізіологічний рівень сірководню у головному мозку втричі більший (до 100 мкмоль/л), ніж у плазмі крові і фактично дорівнює токсичним концентраціям, характерним для плазми [16, 21]. Негативні токсичні ефекти H_2S пов'язані з інгібуванням цитохром-с-оксидази електронно-транспортного ланцюга мітохондрій [19].

Основну роль в ендогенному утворенні H_2S відіграють піридоксаль-5-фосфат-залежні ферменти – цистатіонін- β -синтаза та цистатіонін- γ -ліаза у головному мозку, серцево-судинній системі, печінці, нирках та інших органах [20]. Дослідження, проведені *in vivo* та *in vitro* на щурах із додаванням DL-пропаргілгліцину (специфічний інгібітор цистатіонін- γ -ліази) та L-цистеїну (субстрат цистатіонін- γ -ліази) показали, що саме фермент цистатіонін- γ -ліаза відіграє ключову роль в утворенні H_2S у серцево-судинній системі [26].

Крім того, сірководень є важливою сигнальною молекулою, яка бере участь у багатьох метаболічних шляхах клітини. Відомі внутрішньоклітинні сигнальні механізми, в яких задіяний H_2S , включають активацію АТФ-залежних калієвих каналів (K_{ATP} -каналів) у судинах, міокарді, β -клітинах підшлункової залози, нейронах, підтримку SH-груп білків у відновленому стані, стимулювання аденілатциклази, транспорту цистеїну у клітини і синтезу відновленого глутатіону (GSH), реакції з активними формами кисню і азоту ($\cdot O_2^-$, H_2O_2 , $ONOO^-$, NO), регуляцію індукцйбельної NO-синтази, підвищення внутрішньоклітинного Ca^{2+} тощо [16].

Існує гіпотеза про функціонування сірководню як прекодиційного медіатора.

Оскільки пізня фаза прекодиційування ініціюється експресією різних білків, то однією з можливих функцій H_2S є регулювання транскрипції їх генів [22]. Крім того, сірководень здійснює посттрансляційні модифікації білків, регулює експресію генів, які кодують сигнальні білки та транскрипційні фактори, інгібує та активує іонні канали, а також бере участь у метаболічних реакціях, впливаючи на функціональний стан мітохондрій.

Серед біологічних ефектів H_2S особливу увагу привертають такі: участь H_2S у регуляції судинного тонуусу [1], скоротливості міокарда, передачі нервових імпульсів, а також у секреції інсуліну. Хоча специфічного тіолового рецептора ще не ідентифіковано, однак відомо, що для здійснення біологічних ефектів у серцево-судинній системі H_2S взаємодіє з іншими біологічними медіаторами та сигнальними індукторами [21]. Відомо, що при різних патологічних станах, зокрема, артеріальній і легеневій гіпертензії, хворобі Альцгеймера, діабеті, пошкодженнях слизової оболонки шлунка і цирозі печінки спостерігається дефіцит H_2S [16].

Різні групи вчених довели, що як екзогенний, так і ендогенний сірководень відіграє важливу роль у протекції клітин від ішемічно-реперфузійних пошкоджень у різних експериментальних моделях [8, 22, 27]. Так, його використання було ефективним у захисті печінки від ішемічно-реперфузійних пошкоджень, при цьому інгібувався розвиток апоптозу і підвищувалась експресія білків теплового шоку 90 (HSP-90) та Bcl-2 [12]. Подібні дослідження виявили кардіопротекторну дію донора сірководню NaHS в умовах оксидативного стресу в експериментальних моделях з використанням клітинної лінії кардіоміоцитів. Показано, що H_2S спричиняв індукцію експресії Bcl-2 та активував Akt-сигнальний шлях, які задіяні у кардіопротекторних механізмах [7]. Крім того, виявлено, що кардіопротекторний

вплив сірководню пов'язаний з функціонуванням K_{ATP} -каналів [9]. Однак механізм його дії і фізіологічна роль у серцево-судинній системі вивчені недостатньо.

Як відомо, однією з основних причин серцево-судинних захворювань при різних патологічних станах і старінні є мітохондріальна дисфункція. Формування неселективної кальційзалежної циклоспоринчутливої мітохондріальної пори (МП) між зовнішньою і внутрішньою мембранами лежить в основі індукції клітинної смерті – апоптозу [10, 11]. Проте роль H_2S у регуляції пороутворення в мітохондріях серця остаточно ще не з'ясована.

Нині актуальною проблемою є пошук медіаторів і з'ясування їх участі у сигнальних механізмах, пов'язаних, зокрема, з регуляцією кальційіндукованого відкриття МП, оскільки підвищена її чутливість до індукторів є причиною розвитку багатьох патологічних станів організму, а також при старінні. Тому метою нашої роботи було дослідити вплив донора сірководню – $NaHS$, а також субстрату його біосинтезу – L -цистеїну у дослідях *in vitro* та *in vivo* на чутливість МП до дії природного індуктора Ca^{2+} у серці дорослих і старих щурів та з'ясувати можливі механізми їх впливу.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, 220–250 г) і старих (24 міс, 300–350 г) щурах лінії Вістар. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. У кожній серії дослідів використано не менше ніж 10–12 тварин.

Серця, видалені з декапітованих щурів, промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl ($4^{\circ}C$). Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [4] і в суспензії органел визначали вміст білка за методом Лоурі.

Відкриття МП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації

набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів. Для цього мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, $трис-HCl$ – 25, KH_2PO_4 – 3; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при $\lambda=520$ нм за 3 хв до і впродовж 15 хв їх набухання за наявності індуктора Ca^{2+} . Зміну рівня набухання органел визначали як різницю у відсотках (Δ ,%) між показником набухання мітохондрій на 15 хв відносно вихідного значення. Концентрація білка становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора з подальшою реєстрацією оптичної густини протягом 15 хв. Одноразове введення щурам таких речовин як, донор сірководню $NaHS$, інгібітор його ендogenous синтезу пропаргілгліцин та амінокислоти L -цистеїну здійснювали внутрішньоочеревинно за 30 хв до декапітації тварин.

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програми Origin 7.0 («Microcall Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дослідях *in vitro* на ізольованих мітохондріях для визначення відкриття МП у серці щурів використовували природний індуктор Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л. Характерні криві спонтанного набухання мітохондрій (контроль у безкальцієвому середовищі) та кальційіндукованого набухання органел, що відбувалося внаслідок відкриття МП, у серці дорослих і старих щурів показані на рис. 1. У безкальцієвому середовищі зміна рівнів (Δ) набухання мітохондрій становила 7 та 12 % у дорослих та старих щурів відповідно. В умовах навантаження мітохондрій кальцієм відбувалось суттєве набухання мітохондрій серця старих щурів ($\Delta = 25$ %), що відрізнялося від такого у дорослих

тварин ($\Delta = 20\%$). Цей факт свідчив про підвищену чутливість кальційіндукованого відкриття МП у серці старих щурів. Слід відмітити, що відкриття МП у серці дорослих щурів повністю пригнічувалося класичним інгібітором циклоспорином А у концентрації 10^{-5} моль/л, а у старих тварин – лише частково (див. рис.1). Ці результати підтверджують той факт, що в мітохондріях серця старих щурів поряд з утворенням класичної МП, частково утворюється неспецифічна нечутлива до циклоспорину А пори [5]. Враховуючи дані попередніх наших досліджень, можна зробити висновок, що описані особливості відкриття МП, що спостерігаються при старінні, пов'язані зі зростанням вмісту активних форм кисню, зниженням вмісту NO, що продукується конститутивною ізоформою NO-синтази, порушенням кальцієвого гомеостазу тощо [3–5].

На наступному етапі роботи досліджували дію донора сірководню – NaHS у межах концентрацій 10^{-12} - 10^{-4} моль/л щодо набухання ізольованих мітохондрій серця дорослих і старих щурів за відсутності впливу природного індуктора відкриття МП – Ca^{2+} (рис. 2, а). Показано, що за умов дії сірководню в межах концентрацій 10^{-12} – 10^{-8} моль/л відбувалося помірне незалежне

від дії кальцію набухання мітохондрій серця в обох групах тварин. При дії NaHS у концентрації 10^{-10} моль/л спостерігали набухання мітохондрій, максимальна зміна рівня якого становила 11 та 15 % у дорослих і старих щурів відповідно. Отже, NaHS у досліджуваному діапазоні концентрацій за відсутності Ca^{2+} спричиняв однаковий характер набухання мітохондрій серця, однак його рівень був вищим у старих тварин.

Для встановлення природи H_2S -індукованого набухання мітохондрій використали інгібітор МП - циклоспорин А і специфічний інгібітор мітохондріальних K_{ATP} -каналів - 5-гідроксидеканоат. На рис. 2, б представлені результати дослідів, в яких вивчали внесок мітохондріальних K_{ATP} -каналів у кальційнезалежну провідність мітохондріальних мембран у серці дорослих і старих щурів в умовах дії донора сірководню NaHS у концентрації 10^{-10} моль/л, котра викликала максимальний ефект щодо набухання органел. Використання 5-гідроксидеканоату (10^{-4} моль/л) частково зменшувало набухання мітохондрій, а сумісна його дія з циклоспорином А призводила до набухання на рівні контролю у серці дорослих щурів. У старих щурів 5-гідроксидеканоат спричинював зменшення набухання міто-

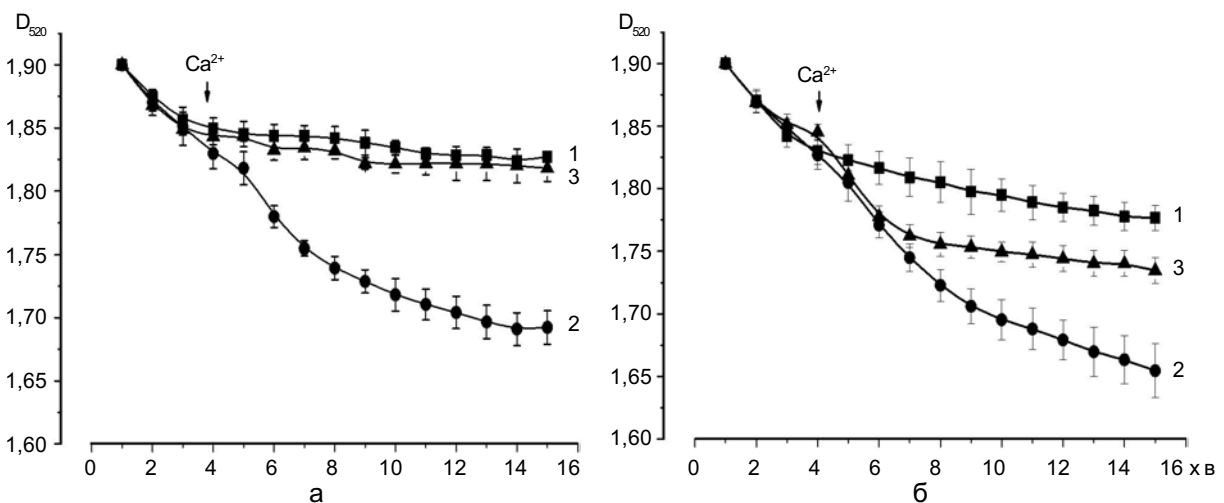


Рис. 1. Набухання мітохондрій серця дорослих (а) та старих (б) щурів за умов дії індуктора мітохондріальної пори Ca^{2+} : 1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3 – преінкубація з циклоспорином А (10^{-5} моль/л), дія Ca^{2+}

хондрій до контрольного значення, а сумісна дія обох інгібіторів – до значень, які навіть нижчі від контрольних. Таким чином, при дії NaHS у наднизькій концентрації (10^{-10} моль/л) набухання мітохондрій спричинене певною мірою активацією мітохондріальних K_{ATP} -каналів як у дорослих, так і старих щурів. Відтак, не можна виключати ймовірну активацію цих каналів в умовах дії донора сірководню у фізіологічних і вищих за них концентраціях.

Вважають, що відкривання K_{ATP} -каналів у гладеньких м'язах відіграє ключову роль у здійсненні ефектів H_2S , оскільки останній підвищує потік K^+ через ці канали і викликає гіперполяризацію мембран в ізольованих гладеньких м'язових клітинах. Глібенкламід, блокатор цих каналів, послаблював гіпотензивний ефект H_2S in vivo і вазодилататорний in vitro [24].

Цікаво, що інгібітори цистатіонін- γ -ліази знижували АТФ-залежний калієвий потік, що свідчить про постійну активацію каналів ендогенним H_2S за фізіологічних умов [18]. Відомо, що клітини міокарда містять

велику кількість K_{ATP} -каналів, і численними дослідженнями показано протекторну дію їх активаторів у міокарді, зокрема при ішемії–реперфузії [2]. Дані літератури свідчать, що H_2S бере участь у ішемічному прекодиціонуванні [22]. Однак механізми прояву його кардіпротекторних властивостей H_2S досі вивчені недостатньо.

У наступній серії експериментів досліджували дію донора сірководню NaHS у широкому діапазоні концентрацій 10^{-12} – 10^{-4} моль/л на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів (рис. 3).

Нами було показано, що в умовах преінкубації мітохондрій з донором сірководню у низьких концентраціях (10^{-12} – 10^{-8} моль/л) захисного ефекту щодо кальційіндукованого набухання органел не спостерігали. А в умовах преінкубації ізольованих мітохондрій з NaHS при фізіологічних концентраціях 10^{-6} , 10^{-5} і $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л спостерігали дозозалежне зменшення рівня набухання органел серця у дорослих щурів (31, 76 і 77% відповідно), що свідчить про його захисний

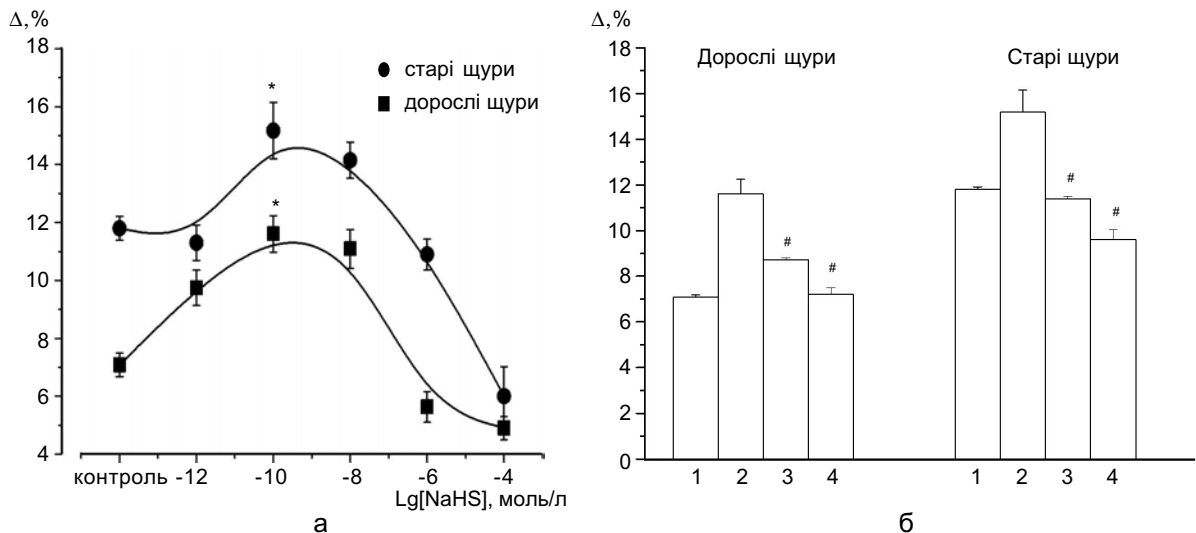


Рис. 2. Концентраційна залежність впливу донора сірководню – NaHS (а) та дія інгібітора мітохондріальних K_{ATP} -каналів 5-гидроксидеканоату та інгібітора мітохондріальної пори – циклоспорино А (б) на набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів у безкальцієвому середовищі: 1 – контроль; 2 – дія NaHS (10^{-10} моль/л); 3 – преінкубація з 5-гидроксидеканоатом (10^{-4} моль/л), дія NaHS; 4 – преінкубація з 5-гидроксидеканоатом і циклоспорином А (10^{-5} моль/л), дія NaHS. Тут і надалі Δ – різниця між показником набухання мітохондрій на 15-й хвилині відносно вихідного значення. * $P < 0,05$ відносно контролю дорослих і старих щурів; # $P_{2,3} < 0,05$; # $P_{2,4} < 0,05$

ефект щодо відкриття МП (див. рис. 3, а). На рис. 3, б представлено результати досліджень дії NaHS (10^{-6} - 10^{-5} моль/л) відносно кальційіндукованого набухання мітохондрій у серці старих щурів. NaHS в концентрації 10^{-5} моль/л повністю попереджав набухання мітохондрій, що можливо також свідчить про відновлення та стабілізацію мітохондріальних мембран у серці старих тварин, а у концентрації 10^{-6} моль/л був неефективним.

Преінкубація суспензії мітохондрій серця зі специфічним інгібітором мітохондріальних K_{ATP} -каналів 5-гідроксидеканоатом (10^{-4} моль/л) спричиняла послаблення протекторного ефекту донора сірководню NaHS (10^{-5} моль/л) щодо кальційіндукованого відкриття МП: частково збільшувався рівень набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів. Це говорить про ймовірне залучення мітохондріальних K_{ATP} -каналів у H_2S -залежне інгібування пороутворення у цих щурів.

Слід відмітити, що при дії донора сірководню у концентрації 10^{-6} та 10^{-5} моль/л, чутливість МП до Ca^{2+} у серці старих щурів нижча у порівнянні з дорослими тваринами (рис. 4). У високих концентраціях донор (10^{-4} моль/л) викликав значне інгібування каль-

ційіндукованої МП як у дорослих, так і старих тварин. Отже, в цілому за дії фізіологічних концентрацій донора сірководню (10^{-6} - 10^{-5} моль/л) було виявлено підвищену чутливість МП до індуктора її відкриття Ca^{2+} у серці дорослих щурів порівняно зі старими. У концентрації, вищій за фізіологічну, NaHS (10^{-4} моль/л) також попереджав кальційіндуковане відкриття МП: набухання мітохондрій серця дорослих щурів було нижчим за контрольний рівень, а старих щурів – суттєво зменшене щодо контролю (у відсутності індуктора МП – Ca^{2+}). Крім того, на ізольованих мітохондріях серця старих щурів спостерігали підвищену проникність мембран органел, яка значно зменшувалась за наявності донора сірководню в концентрації 10^{-4} моль/л. Зниження рівня набухання мітохондрій, оптична густина яких була більшою у порівнянні з нативними органелами серця дорослих і старих щурів при дії NaHS у концентрації 10^{-4} моль/л, можна пояснити особливостями конформаційних змін мембран органел, а також уповільненням їх метаболічної активності, що зумовлюють проникність мембран і пов'язане з цим відкриття МП [16].

Різні концентрації сірководню неод-

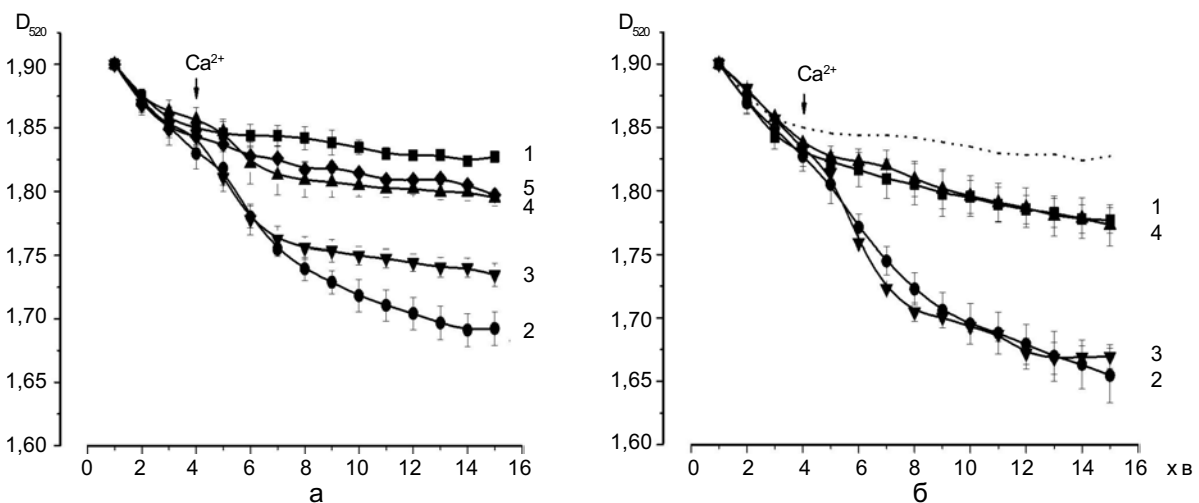


Рис. 3. Дія донора сірководню на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця дорослих (а) та старих (б) щурів: 1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3, 4, 5 – преінкубація з NaHS (10^{-6} , 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л відповідно) і дія Ca^{2+}

наково впливають на функції клітини та організму в цілому. Завдяки своїй хімічній структурі та біохімічним властивостям H_2S може легко проникати до клітини крізь плазматичну мембрану без використання специфічних транспортних молекул і викликати певні біологічні ефекти при фізіологічних концентраціях, і токсичний ефект – при високих дозах. Показано [9], що дія H_2S у мікромольних концентраціях супроводжується цитопротекторним ефектом (антинекротичним і антиапоптотичним), що пов'язується із його здатністю нейтралізувати велику кількість активних форм кисню та інших (оксидорадикали, пероксинітрит, гіпохлоридна кислота, гомоцистеїн). H_2S позитивно впливає на антиоксидантну систему та разом N-ацетилцистеїном, глутатіоном і супероксиддисмутазою сприяє посиленню адаптивних ефектів [13].

H_2S як тіолвмісна молекула з сильними відновними властивостями здійснює також контроль за окисно-відновним потенціалом клітини разом із іншими тіолами – цистеїном і глутатіоном [25]. Іншим механізмом, за допомогою якого сірководень здійснює свій

цитопротекторний вплив, є підвищення внутрішньоклітинної концентрації глутатіону через активацію експресії γ -глутамілцистеїнсинтази.

З іншого боку, H_2S може інгібувати клітинне дихання, послаблюючи активність цитохромоксидази, що є механізмом регуляції споживання кисню клітиною. Цей механізм залучений у здійснення фармакологічних і токсичних ефектів дії H_2S , а також є основою тимчасової затримки життєвих функцій [14]. Так, рівень мітохондріальних ушкоджень змінювався відповідно до умов експерименту і залежав від виду тканини: у цілих клітинах мітохондріальне дихання знижувалося до 50% при дії H_2S у концентрації 30 мкмоль/л, тоді як 10 мкмоль/л достатньо для зменшення вдвічі дихання у ізольованих мітохондріях. Гідросульфід натрію у концентраціях нижчих за 20 мкмоль/л стимулював споживання кисню мітохондріями і збільшував мембранний потенціал, а у високій концентрації інгібував цитохром-с-оксидазу і погіршував споживання кисню [19].

Натомість, високі концентрації сірковод-

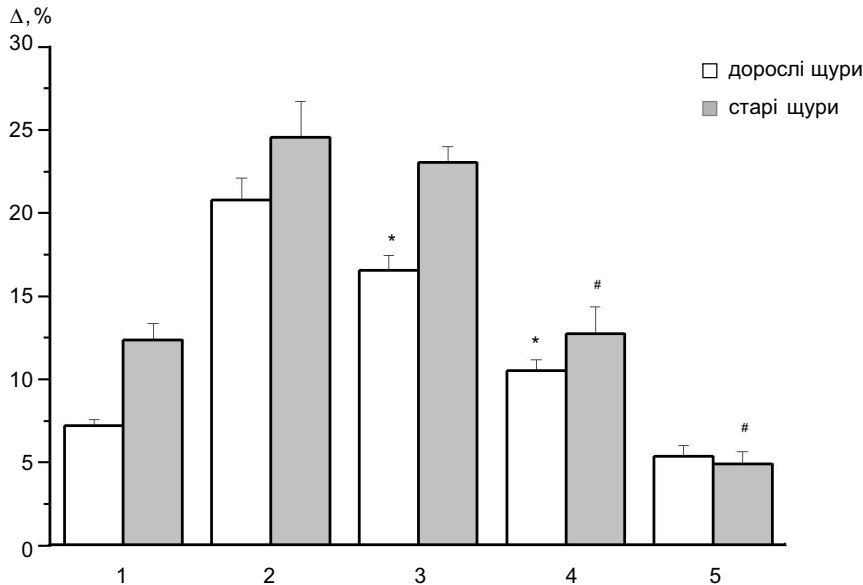


Рис. 4. Порівняння дії донора сірководню на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів: 1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3, 4, 5 – преінкубація з $NaHS$ (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} моль/л відповідно), дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л). * $P < 0,05$, # $P < 0,05$ відносно набухання мітохондрій в умовах дії Ca^{2+} (10^{-4} моль/л)

ню є токсичними для клітини через утворення великої кількості вільних радикалів та окисників, мобілізації кальцію, зменшення вмісту глутатіону в клітині, вивільнення внутрішньоклітинного заліза, а також індукцію мітохондріальних сигнальних шляхів апоптозу [18].

Серце є важливим джерелом утворення ендogenous H₂S [8]. За даними літератури, його концентрація у серцево-судинній системі щурів становить (45,6±14,2) мкмоль/л, а утворення у тканинах міокарда щурів прирівнюється до (18,64±4,49) нмоль·хв⁻¹·г⁻¹ білка [26]. Отримані нами результати вказують на те, що інгібування МП сірководнем відбувалося за фізіологічних його концентрацій, тобто при 1–50 мкмоль/л.

Таким чином, встановлено, що донор сірководню NaHS у межах досліджуваних концентрацій 10⁻¹²–10⁻⁴ моль/л спричиняв неоднозначну дію щодо набухання мітохондрій: низькі його концентрації (10⁻¹²–10⁻⁸ моль/л) підвищували набухання органел, а більш високі концентрації (10⁻⁶–5·10⁻⁵ моль/л) здійснювали протекторний ефект відносно кальційіндукованого набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів. Як підтверджують результати експериментів, це від-

бувається частково внаслідок активації мітохондріальних K_{ATP}-каналів і можливо внаслідок прямого впливу донора сірководню NaHS як SH-реагента на мітохондріальні мембрани та структурні компоненти МП.

В експериментах *in vivo* при дослідженні одноразового введення щурам NaHS (10⁻⁴ моль/кг) і амінокислоти L-цистеїну (10⁻³ моль/кг) як субстрату для синтезу сірководню, було встановлено зменшення чутливості МП до індуктора Ca²⁺ у серці дорослих і старих тварин (рис. 5). Дія L-цистеїну у порівнянні з NaHS виявилася більш ефективною щодо попередження кальційіндукованого відкриття МП: спостерігали збільшення на порядок концентрації Ca²⁺, яка спричиняла набухання мітохондрій у серці дорослих і старих щурів. Цей факт пояснюється можливим залученням L-цистеїну до ендogenous шляхів синтезу сірководню, а також його антиоксидантними властивостями. Слід відмітити, що дія донора сірководню *in vivo*, на відміну від L-цистеїну, була швидкою та транзитornoю, оскільки через 60 хв після введення його щурам не спостерігали зміни рівня набухання мітохондрій або цей ефект був незначний.

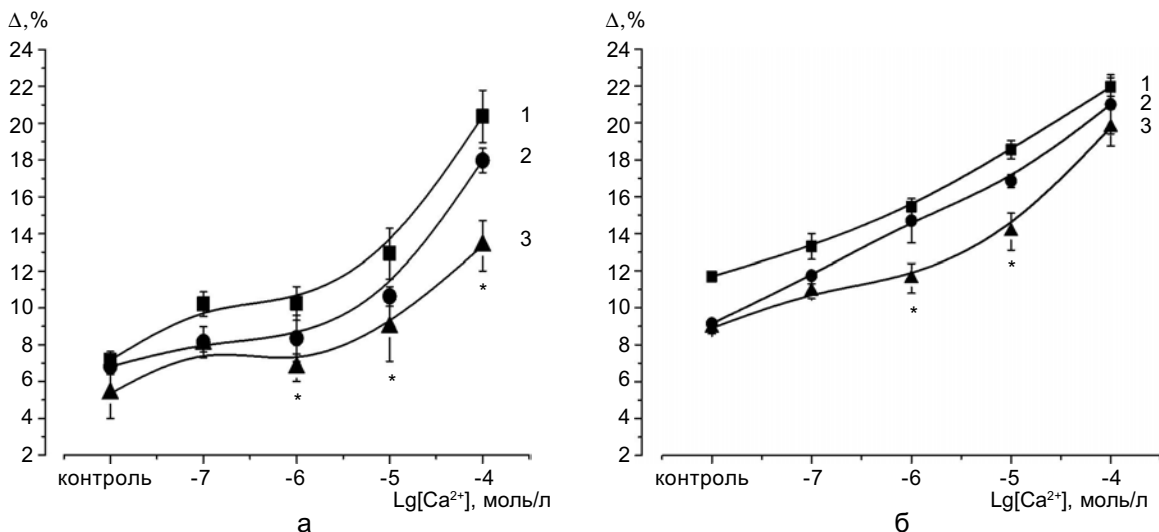


Рис. 5. Зміни чутливості мітохондріальної пори до індуктора її відкриття – Ca²⁺ у серці дорослих (а) та старих (б) щурів за умов впливу *in vivo* NaHS і L-цистеїну: 1 – контроль; 2 – дія NaHS (10⁻⁴ моль/кг); 3 – дія L-цистеїну (10⁻³ моль/кг). *P<0,05 відносно контролю

Для з'ясування ролі ендogenous сiрководню у регуляцiї вiдкриття МП у серцi дорослих i старих щурiв була проведена серiя експериментiв з використанням специфiчного блокатора ферменту цистатионiн- γ -лiази – пропаргiлглiцину у концентрацiї 10^{-4} моль/кг (рис.6). У дорослих щурiв спостерiгали тенденцiю до збiльшення чутливостi кальцiйiндукованої МП, тодi як у старих - значне її пiдвищення внаслiдок зменшення на два порядки порогової концентрацiї Ca^{2+} , яка спричиняє набухання органел. У фiзiологiчних умовах органiзму ендogenous сiрководень iмовiрно чинить стабiлізувальну дiю на мембрани мiтохондрiй. Ми припустили, що при введеннi iнгiбитора синтезу сiрководню пропаргiлглiцину ендogenous вiмст газового трансмитера може суттєво зменшуватися, що призводить до пiдвищення чутливостi МП до iндуктора її вiдкриття – Ca^{2+} . У зв'язку з цим знижений вiмст H_2S при старiннi може бути наслiдком або зменшення експресiї H_2S -синтезуючого ферменту цистатионiн- γ -лiази, або його каталiтичної активностi. Таким чином, зниження вiмсту ендogenous сiрководню спричиняє пiдвищення порогy чутливостi МП до кальцiю.

Пiдiбний ефект спостерiгли у разi пiдвищення чутливостi МП до дiї iндуктора Ca^{2+} за умов впливу iнгiбитора конститутивної NO-синтази L-NAME [6]. Данi лiтератури вказують на можливу взаємодiю обох газових трансмитерiв – NO та H_2S , що може мати важливе фiзiологiчне значення. Так, було показано, що H_2S здатний як посилювати, так i послаблювати дилаторну дiю NO у аортi щурiв, тодi як саме NO iндукує вивiльнення H_2S у судинах щурiв, а також пiдвищує експресiю цистатионiн- γ -лiази у культурi гладеньком'язових клiтин судин [17].

Вважають, що NO та пероксинiтри можуть взаємодiяти з H_2S , формуючи нiтрозотiоли, якi регулюють фiзiологiчну дiю NO та H_2S . Важливо зазначити, що останнiй здатний iнгiбувати продукування NO та експресiю гена iндуцибельної NO-синтази у макрофагах [26]. Механiзм цiєї дiї ще не встановлено, однак вiдомо, що вiн включає експресiю гемоксигенази та утворення CO. Було також показано, що донор H_2S , NaHS, дозозалежно знижує активнiсть iндуцибельної NO-синтази через iнгiбування процесу перетворення аргiнiну на цитрулiн [15].

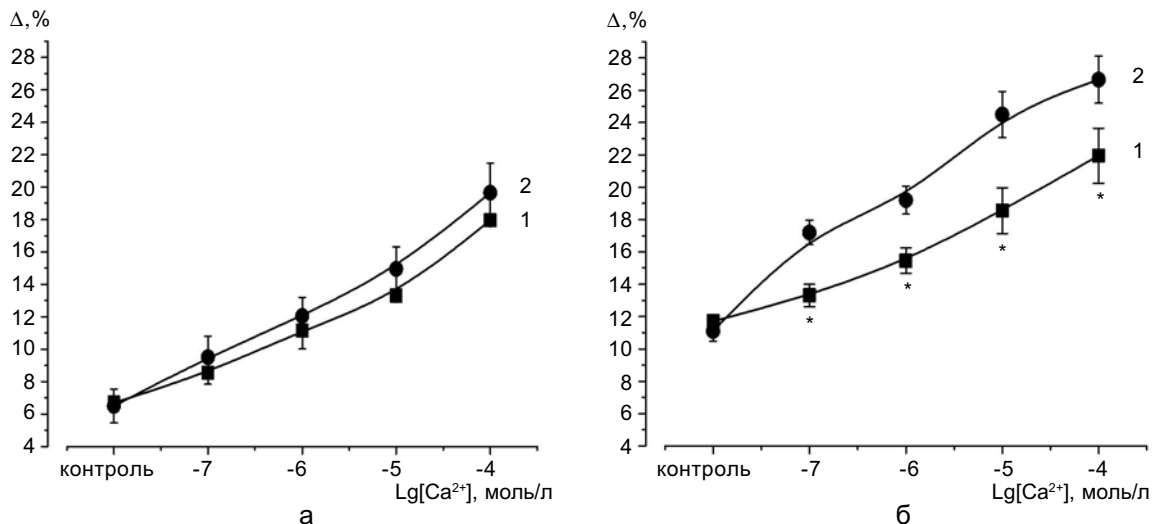


Рис. 6. Змiни чутливостi мiтохондрiальної пори до iндуктора її вiдкриття – Ca^{2+} у серцi дорослих щурiв (а) та старих (б) щурiв за умов впливу *in vivo* пропаргiлглiцину: 1 – контроль; 2 – дiя пропаргiлглiцину (10^{-4} моль/кг). * $P < 0,05$ вiдносно контролю

Оскільки молекула H_2S має сильні відновні властивості, ми робимо припущення, що протекторні ефекти цієї молекули у фізіологічних концентраціях можуть бути пов'язані з захистом тіолових груп білків, зокрема одного з компонентів МП – аденін-нуклеотидтранслокази, від окиснення (прямий вплив). Окрім того, захисні ефекти, які спостерігаються при дії сірководню на мітохондрії, можуть бути частково викликані активацією мітохондріальних K_{ATP} -каналів (опосередкований вплив).

Таким чином, отримані нами результати свідчать про участь як екзогенного, так і ендogenous сірководню у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран, зокрема, через інгібування кальційіндукованого відкриття МП у серці дорослих і старих щурів, тому H_2S може бути важливим регуляторним фактором у серцево-судинній системі за фізіологічних та патологічних умов.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено дозозалежний вплив донора сірководню NaHS (10^{-12} – 10^{-4} моль/л) у безкальцієвому середовищі щодо набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів.

2. Доведено, що NaHS у фізіологічних концентраціях (10^{-6} – $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) пригнічує кальційіндуковане відкриття МП, що свідчить про його протекторний вплив на пороутворення у серці дорослих і старих щурів.

3. Преінкубація ізольованих мітохондрій з інгібітором мітохондріальних K_{ATP} -каналів 5-гідроксидеканоатом (10^{-4} моль/л) спричиняє послаблення протекторного ефекту NaHS (10^{-5} моль/л) кальційіндукованого відкриття МП: частково збільшується рівень набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів.

4. В експериментах *in vivo* при одноразовому внутрішньоочеревинному введенні щурам як NaHS (10^{-4} моль/кг), так і L-цистеїну (10^{-3} моль/кг) показано зменшення

чутливості МП до індуктора її відкриття Ca^{2+} у серці дорослих і старих тварин.

5. За умов інгібування *in vivo* біосинтезу сірководню при одноразовому внутрішньоочеревинному введенні щурам пропаргіл-гліцину (10^{-4} моль/кг) слід відмітити незначне підвищення чутливості кальційіндукованого відкриття МП у серці дорослих та суттєве – внаслідок зменшення на два порядки порогової концентрації Ca^{2+} , яка спричиняє набухання органел у старих тварин.

**Н.А. Струтинская, Е.Н. Семенихина,
С.В. Черная, Г. Л. Вавилова, В. Ф. Сагач**

СЕРОВОДОРОД УГНЕТАЕТ КАЛЬЦИЙИНДУЦИРОВАННОЕ ОТКРЫВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ В СЕРДЦЕ ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС

В опытах *in vivo* и *in vitro* на митохондриях, изолированных из ткани сердца взрослых и старых крыс, исследовали влияние донора сероводорода – NaHS, а также субстрата его биосинтеза – L-цистеина, на чувствительность митохондриальной поры (МП) к ее естественному индуктору Ca^{2+} . Установлена концентрационная зависимость влияния NaHS (10^{-12} – 10^{-4} моль/л) на набухание митохондрий сердца крыс. Показано, что в бескальциевой среде при действии донора сероводорода (10^{-12} – 10^{-8} моль/л) происходило умеренное набухание митохондрий сердца крыс. NaHS в концентрации 10^{-10} моль/л вызывал набухание митохондрий, изменение максимальной величины (Δ) которого составляло 11 и 15 % у взрослых и старых крыс соответственно. Специфический ингибитор митохондриальных K_{ATP} -каналов 5-гидроксидеканоат (10^{-4} моль/л) уменьшал набухание митохондрий в присутствии NaHS (10^{-10} моль/л), что может свидетельствовать о вкладе этих каналов в кальцийнезависимую проводимость мембран органелл в сердце. Донор сероводорода в физиологических концентрациях 10^{-6} , 10^{-5} и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л ингибировал кальцийиндуцированное открывание МП, что свидетельствует о его протекторном по отношению к порообразованию эффекте, который составлял 31, 76 и 77 % соответственно в сердце взрослых крыс. А у старых животных его наблюдали только при концентрации NaHS 10^{-5} моль/л. Таким образом, донор сероводорода в диапазоне исследуемых концентраций 10^{-12} – 10^{-4} моль/л оказывал неоднозначное влияние на набухание митохондрий: низкие концентрации (10^{-12} – 10^{-8} моль/л) увеличивали его, а физиологические (10^{-6} – $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) – оказывали протекторный эффект на кальцийиндуцированное набухание митохондрий сердца крыс. Преинкубация

изолированных митохондрий с 5-гидроксидеканоатом (10^{-4} моль/л) уменьшала защитный эффект NaHS (10^{-5} моль/л) на кальцийиндуцированное открывание МП, что свидетельствует о возможном участии митохондриальных K_{ATP} -каналов в зависимом от сероводорода ингибировании порообразования в сердце крыс. В экспериментах *in vivo* при однократном внутривенном введении как NaHS (10^{-4} моль/кг), так и L-цистеина (10^{-3} моль/кг) показано уменьшение чувствительности МП к индуктору Ca^{2+} в сердце взрослых и старых крыс. L-цистеин по сравнению с NaHS оказался более эффективным относительно предупреждения кальцийиндуцированного открывания МП: наблюдали увеличение на порядок концентрации Ca^{2+} , которая вызывала набухание митохондрий в сердце животных. В опытах *in vivo* при использовании специфического блокатора фермента цистатионин-γ-лиазы – пропаргилглицина (10^{-4} моль/кг), участвующего в биосинтезе сероводорода, наблюдали значительное увеличение чувствительности МП к индуктору Ca^{2+} вследствие уменьшения на два порядка пороговой его концентрации, вызывающей набухание органелл. Показана причастность эндогенного сероводорода к регуляции порообразования в сердце. Таким образом, результаты исследований свидетельствуют об участии сероводорода в модуляции изменений проницаемости митохондриальных мембран, что может быть важным регуляторным фактором в развитии сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: сероводород, L-цистеин, митохондриальная пора, сердце, старение, крысы.

**N.A. Strutynska, O.M. Semenykhina,
S.V. Chorna, G.L.Vavilova, V.F. Sagach**

HYDROGEN SULFIDE INHIBITS Ca²⁺-INDUCED MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING IN ADULT AND OLD RAT HEART

In experiments *in vivo* and *in vitro* on the mitochondria isolated from adult and old rat hearts, we studied the effects of a donor of hydrogen sulfide (H_2S), NaHS, and H_2S biosynthesis substrate, L-cysteine, on the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening to its natural inductor, Ca^{2+} . We found that NaHS (10^{-12} to 10^{-4} mol/l) influenced mitochondrial swelling in a concentration-dependent manner. It was also demonstrated that the addition of NaHS (10^{-12} to 10^{-8} mol/l) to the calcium-free medium resulted in moderate a swelling of mitochondria from both adult and old rat hearts. At 10^{-10} mol/l NaHS, the maximal values of the mitochondrial swelling observed in both adult and old hearts were 11 and 15 %, respectively. A specific inhibitor of K_{ATP} -channels, 5-hydroxydecanoate (5-HD; 10^{-4} mol/l) decreased the mitochondrial swelling in the presence of NaHS (10^{-10} mol/l), which can be indicative of the contribution of these channels to the calcium-independent conductance of the mitochondrial membranes in the rat hearts. The H_2S donor NaHS used in

physiological concentrations (10^{-6} , 10^{-5} and $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) exerted the inhibiting effect on the Ca^{2+} -induced mPTP opening in adult hearts (corresponding values of such effect were 31, 76, and 77%, respectively), while in old hearts the protector effect of NaHS was observed only at its concentration of 10^{-5} mol/l. Therefore, the donor of H_2S used in the tested concentrations (10^{-12} to 10^{-4} mol/l) exerted ambiguous effect on the mitochondrial swelling: low concentrations of NaHS (10^{-12} to 10^{-8} mol/l) increased the mitochondrial swelling, while its physiological concentrations (10^{-6} to $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) exerted the protective effect on Ca^{2+} -induced mitochondrial swelling in adult and old hearts. Pre-incubation of isolated mitochondria with 5-HD (10^{-4} mol/l) resulted in a decrease in the protective effect evoked by NaHS (10^{-5} mol/l) on Ca^{2+} -induced mPTP opening, which is indicative of the possible involvement of mitochondrial K_{ATP} -channels in the H_2S -dependent inhibition of mPTP formation in both adult and old rat hearts. In experiments *in vivo*, single intraperitoneal injections of both NaHS (10^{-4} mol/kg) and L-cysteine (10^{-3} mol/kg) resulted in a decrease in the sensitivity of mPTP to its inductor Ca^{2+} in adult and old rat hearts. The action of L-cysteine, as compared with that of NaHS, was more effective in prevention of Ca^{2+} -induced mitochondrial swelling. We observed a rise in Ca^{2+} concentration by one order of magnitude, which evoked the mitochondrial swelling in adult and old hearts. In experiments *in vivo* in which we used a specific blocker of cystathionine-γ-lyase, propargylglycine (10^{-4} mol/kg) that is involved in the synthesis of H_2S , we observed an increase in the sensitivity of mPTP opening in old hearts because of a decrease in the threshold Ca^{2+} concentration required for mitochondrial swelling by two orders of magnitude. We demonstrate the involvement of endogenous H_2S in the control of mPTP formation in adult and old hearts. Our studies are indicative of the involvement of H_2S in modulation of changes in the permeability of mitochondrial membranes, which can be an important regulatory factor in the development of cardiovascular diseases.

Keywords: hydrogen sulfide, L-cysteine, mitochondrial permeability transition pore, heart, aging, rats.

O.O.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Баскаков М.Б., Гусакова С.В., Желудева А.С., Смаглий Л.В., Ковалев И.В., Вторушина Т.А., Носов Д.С., Еременко К.В., Медведев М.А., Орлов С.Н. Влияние сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы // Бюл. сибир. медицины. – 2010. – №6. – С. 12–17.
2. Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка, 2008. – С. 206–251.
3. Сагач В.Ф., Рудик О.В., Вавілова Г.Л., Коцюруба А.В., Ткаченко Ю.П. Мелатонін відновлює ішемічну толерантність та зменшує чутливість відкриття

- мітохондріальної пори в серці старих щурів // Фізіол. журн. – 2006. – **52**, №3. – С. 3–14.
4. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Рудик О.В., Струтинська Н.А. Вивільнення неіденти-фікованих речовин мітохондріального походження – показник відкриття мітохондріальної пори серця щурів // Там само. – 2003. – **49**, №5. – С. 3–12.
 5. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Рудик О.В. Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори в серці щурів // Там само. – 2004. – **50**, №2. – С. 49–63.
 6. Шиманская Т.В., Добровольский Ф.В., Вавилова Г.Л., Струтинская Н.А., Рудик Е.В., Сагач В.Ф. NO-зависимая модуляция чувствительности открытия митохондриальной поры при ишемии/реперфузии изолированного сердца // Рос. физиол. журн. – 2009. – **95**, №1. – С. 28–37.
 7. Cai W.J., Wang M.J., Moore P.K., Jin H.M., Yao T., Zhu Y.C. The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation // Cardiovasc. Res. – 2007. – **76**. – P. 29–34.
 8. Chang L., Geng B., Yu F., Zhao J., Jiang H., Du J, Tang C. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats // Amino Acids. – 2008. – **34**. – P. 573–585.
 9. Elsey D.J., Fowkes R.C., Baxter G.F. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulphide (H S) // Cell. Biochem. Funct. – 2010. – **28**. – P. 95–106.²
 10. Halestrap A. What is the mitochondrial permeability transition pore? // Molecular and cell. Cardiol. – 2009. – **46**. – P.821–831.
 11. Javadov S, Karmazyn M, Escobales N. Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases // Pharmacol. Exp. Ther. – 2009. – **330**(3) – P. 670–678.
 12. Ji Y., Pang Q.F., Xu G., Wang L., Wang J.K., Zeng Y.M. Exogenous hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury // Eur. J. Pharmacol. – 2008. – **587**. – P. 1–7.
 13. Kapoor A., Thiernemann C. Hydrogen sulfide, neurogenic inflammation, and cardioprotection: a tale of rotten eggs and vanilloid receptors // Crit. Care Med. – 2010. – **38**. – P. 728–730.
 14. Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions // Amino Acids. – 2010. – **45**. – P. 56–61.
 15. Kubo S., Doe I., Kurokawa Y., Nishikawa H., Kawabata A. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: Contribution to dual modulation of vascular tension // Toxicology. – 2007. – **232**. – P. 138–146.
 16. Lowicka E., Beltowski J. Hydrogen sulfide (H S) – the third gas of interest for pharmacologists // Pharmacol. Rep. – 2007. – **59**. – P. 4–24.
 17. Li L., Hsu A., Moore P.K. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation – a tale of three gases // Pharmacol. Ther. – 2009. – **123**. – P. 386–400.
 18. Li L., Rose P., Moore P.K. Hydrogen sulphide and cell signalling // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2011. – **51**. – P. 169–187.
 19. Mancardi D., Penna C., Merlino A., Del Soldato P, Wink D.A., Pagliaro P. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter : hydrogen sulphide // Biochem. Biophys. Acta. – 2009. – **1787**. – P. 864–872.
 20. Rui W. Two's company, three's a crowd: can H S be the third endogenous gaseous transmitter // FASEB J. – 2002. – **16**. – P. 1792–1798.
 21. Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential // Nat. Rev. Drug Discov. – 2007. – **6**. – P. 917–935.
 22. Sivarajah A., Collino M., Yasin M., Benetti E., Gallicchio M., Mazzon E, Cuzzocrea S, Fantozzi R, Thiernemann C. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R // Shock. – 2009. – **31**. – P. 267–274.
 23. Stipanuk M.H. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine // Annu. Rev. Nutr. – 2004. – **24**. – P. 539–577.
 24. Tang G., Wu L., Liang W., Wang R. Direct stimulation of K-ATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells // Mol. Pharmacol. – 2005. – **68**. – P. 1757–1764.
 25. Wagner F., Asfar P., Calzia E., Radermacher P., Szaby C. Bench-to bedside review: Hydrogen sulfide – the third gaseous transmitter: applications for critical care // Critical Care. – 2009. – **13**. – P. 213–222.
 26. Whiteman M., Moore P.K. Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability // J. Cell. Mol. Med. – 2009. – **13**. – P. 488–507.
 27. Zhu Y.Z., Wang Z.J., Ho P., Loke Y.Y., Zhu Y.C., Huang S.H., Tan C.S., Whiteman M., Lu J., Moore P.K. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats // Appl. Physiol. – 2007. – **102**. – P. 261–268.