

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ НАН УКРАЇНИ

ЛУЧКОВА АЛІНА ЮРІЇВНА

УДК 546.221.1:576.311.347:612.172:546.41

**РОЛЬ СІРКОВОДНЮ (H_2S) У РЕГУЛЯЦІЇ КАЛЬЦІЄВОГО ГОМЕОСТАЗУ
ТА ФУНКЦІЙ МІТОХОНДРІЙ СЕРЦЯ ДОРΟΣЛИХ І СТАРИХ ЩУРІВ**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Науковий керівник:

член-кор. НАНУ, д.м.н., професор

Сагач Вадим Федорович

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

завідувач відділу фізіології кровообігу

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор

Манько Володимир Васильович,

Львівський національний університет імені Івана Франка,

завідувач кафедри фізіології людини і тварин

доктор біологічних наук, професор

Янчук Петро Іванович,

ІНЦ «Інститут біології і медицини»,

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,

професор кафедри фізіології людини і тварин

Захист відбудеться «23» *червня* 2020 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О.

Богомольця НАН України та на сайті інституту:

http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий «22» *травня* 2020 року

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01

кандидат біологічних наук



О.П. Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Сірководень (H_2S) – член родини газотрансмітерів, що ендогенно синтезується в організмі ссавців та виконує низку регуляторних функцій. У серцево-судинній системі H_2S діє як вазодилататор, активуючи K_{ATF} -залежні канали [Nosoki 1997, Kimura 1996], проявляє антиоксидантні властивості через підвищення активності Mn- та Cu-супероксиддисмутази, а також зниження вмісту активних форм кисню (АФК) в кардіоміоцитах під час ішемії-реперфузії [Sun, 2012]. H_2S стимулює ангиогенез, посилюючи експресію ростового фактора VEGF та активуючи фосфатидилінозитол-3-кіназу [Shen, 2014]. Він також активує ендотеліальну NO-синтазу (eNOS), відновлює спряження конститутивних NOS, попереджає апоптоз кардіоміоцитів, пригнічуючи індукцію каспази-3 та відкривання неспецифічного мегаканалу мітохондріальної пори (МП) [Strutynska, 2011] і регулює експресію міРНК [Shen, 2012]. Механізми дії сірководню різноманітні: відновлення SH-груп білків, вплив через протеїнкіназу C та транскрипційний фактор Nrf2, взаємодія з різними типами іонних каналів, зокрема ATF-залежними та кальційзалежними калієвими каналами [Strutynska, 2011], а також Ca^{2+} -каналами L- та T-типів [Munaron, 2013]. Існує три ферменти синтезу сірководню: цистатіонін- β -синтаза (cystathionine β -synthase – CBS), цистатіонін- γ -ліаза (cystathionine γ -lyase – CSE) та 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase – 3-MPST), яка працює разом з цистеїнамінотрасферазою (cysteine aminotransferase – CAT). Ці ензими використовують амінокислоту L-цистеїн як джерело SH-груп, а також характеризуються різним розподіленням в системах організму [Singh 2011]. Раніше вважалося, що у серцево-судинній системі переважає CSE, експресія гена якого значно вища у тканинах серця та судин. Проте нещодавно показано, що важливу роль у коронарних артеріях відіграє сірководень, утворений ензимом 3-MPST [Куо, 2016]. До того ж відомо, що останній локалізується не лише в цитозолі клітин, а й в мітохондріях, що свідчить про фізіологічну роль сірководню в цих органелах. Щодо функцій H_2S в мітохондріях, відомо, що у високих концентраціях він пригнічує роботу IV комплексу дихального ланцюга, а у фізіологічних – може бути неорганічним донором електронів для електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ) [Szabo 2013]. Ендогенний H_2S , що виробляється мітохондріально локалізованим 3-MPST, підтримує базальні, фізіологічні клітинні, біоенергетичні функції, при цьому активність цієї метаболічної підтримки знижується з фізіологічним старінням [Kimura 2010]. За деяких умов, зокрема при перевантаженні клітин гладеньких м'язів судин кальцієм, у ракових клітинах товстого кишечника, CSE та CBS також можуть асоціюватися з мітохондріями, а H_2S , що виробляється цими ферментами, слугує ендогенним стимулятором клітинної біоенергетики [Szabo 2013]. Проте

мало відомо про регуляцію сірководнем кальцієвого гомеостазу у мітохондріях клітин серця, а він є важливим фактором нормального функціонування органел і організму в цілому. Відомо, що акумулювання кальцію в мітохондріях відіграє ключову роль в регуляції багатьох функцій клітин, починаючи від синтезу АТФ до загибелі клітин шляхом апоптозу [Glancy 2012, Hunter 1979]. Збільшення концентрації мітохондріального Ca^{2+} активує дегідрогенази і транспортери, призводячи до підвищення частоти мітохондріального дихання та екструзії протонів, результатом чого є утворення необхідної кількості АТФ для стабілізації енергетичного стану клітини. Однак тривале підвищення його вмісту в цих органелах призводить до відкривання МП, що є критичною подією у розвитку апоптозу і загибелі клітин. Відомо також, що за фізіологічного старіння вхід кальцію в органели підвищується [Luchkova 2018], а МП стає більш чутливою до нього і може легше переходити в стан високої провідності [Sagach, 2004]. Також при старінні значно підвищується вміст вільних радикалів в клітинах. Оскільки кількість людей старшого віку у світі невинно зростає, нам було цікаво провести дослідження по вивченню регуляції сірководнем гомеостазу кальцію в мітохондріях паралельно на двох моделях: дорослих і старих тваринах. Таким чином, у роботі досліджували регуляцію сірководнем кальцієвого обміну у мітохондріях, а також його вплив на функції ЕТЛ органел серця щурів різного віку.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в межах наукової тематики відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Вивчення впливу сірководню на діяльність серця, судинний тонус і функціональний стан мітохондрій», 2010-2013рр. (№ держреєстрації 0107U005336) та «Дослідження ролі сигнальних сполук сірки в реакціях серцево-судинної системи щурів при різних станах організму», 2014-2018рр. (№ держреєстрації 0113U007276).

Мета і завдання дослідження: дослідити роль сірководню у регуляції кальцієвого гомеостазу та функцій мітохондрій серця дорослих та старих щурів.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Дослідити вплив блокади мітохондріального ферменту 3-MPST на функціональний стан і реакції серця.
2. Дослідити вплив пригнічення мітохондріального шляху синтезу сірководню на показники окисного стресу такі як $\cdot\text{O}$ та $\cdot\text{OH}$ радикали, активність перекисного окиснення ліпідів та активність iNOS та cNOS як в мітохондріях серця, так і в плазмі крові дослідних щурів.
3. Виявити вплив екзогенного та ендогенного сірководню на накопичення кальцію мітохондріями серця дорослих та старих щурів.
4. Дослідити вплив інгібування ендогенного сірководню на чутливість МП до Ca^{2+} у дорослих та старих щурів.

5. Вивчити вплив пригнічення мітохондріального синтезу сірководню на функціональний стан дихального ланцюга мітохондрій серця щурів.

Об'єкт дослідження: кальцієвий гомеостаз в мітохондріях серця щурів різного віку.

Предмет дослідження: роль сірководню та вплив ендogenous H₂S на функціонування мітохондрій серця дорослих і старих щурів.

Методи дослідження: виділення мітохондрій методом диференційного центрифугування; вивчення накопичення кальцію у мітохондріях з використанням флуоресцентного кальційчутливого барвника Fluo-4 AM та проточного цитофлуориметра; дослідження відкривання мітохондріальної пори за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання органел серця за наявності індукторів; полярографічне дослідження дихання мітохондрій серця щурів з використанням приладу Охугraph+; перфузія коронарних судин ізольованого серця щурів за методом Лангендорфа та реєстрація скоротливої активності лівого шлуночка в умовах кальцієвих навантажень; дослідження показників оксидативного та нітрозативного стресу а також вмісту сірководню, з використанням біохімічних методів.

Наукова новизна отриманих результатів. Отримано нові результати щодо регуляції сірководнем кальцієвого гомеостазу мітохондрій серця щурів. Вперше показано, що інгібування ферменту синтезу H₂S 3-MPST, який знаходиться, переважно в мітохондріях, призводило до порушення роботи серця, зниження показників кардіодинаміки, зокрема тиску в лівому шлуночку, швидкості скорочення та розслаблення, а також інтенсивності скоротливої функції. При цьому серця дослідних тварин не витримували кальцієвих навантажень. Також з'ясовано, що за умов пригнічення синтезу сірководню зростали показники окисного стресу, такі як супероксидний та гідроксильний радикали, відбувалося посилення перекисного окиснення ліпідів та збільшення активності iNOS на тлі зменшення функціональної активності cNOS як в мітохондріях серця, так і в плазмі крові дослідних щурів. Вперше виявлено, що екзогенний сірководень (10^{-6} - 10^{-7} моль/л) підвищує вхід Ca²⁺ в мітохондрії серця дорослих та старих щурів в умовах кальцієвого навантаження, при цьому він (10^{-5} моль/л NaHS) попереджає відкривання мітохондріальної пори в органелах серця дорослих та старих щурів, що свідчить про регуляцію сірководнем транспорту Ca²⁺ у мітохондріях та важливе фундаментальне значення цього відкриття. У той же час пригнічення ендogenous утворення H₂S *in vivo* знижувало поріг чутливості МП до Ca²⁺ та підвищувало амплітуду набухання мітохондрій серця дорослих та старих щурів за дії інгібітора *in vitro*. Нами вперше показано, що пригнічення мітохондріального ферменту синтезу сірководню *in vivo* знижувало функціональну здатність електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, яка проявлялась у зменшенні швидкості споживання кисню у станах V₂, V₃ та V₄, а також показників дихального контролю та АДФ/О за Чансом.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Отримані в роботі результати мають фундаментальний характер, оскільки розкривають нові механізми дії сірководню у мітохондріях серця щурів і виявляють важливість сірководню, синтезованого у мітохондріях, для нормального функціонування серця. Результати доповнюють існуючі відомості про властивості H_2S як регуляторної молекули та підтверджують необхідність його утворення в мітохондріях. Можуть бути використані при підготовці лекцій чи спеціалізованих курсів з клітинного сигналювання чи регуляції функціонування серцево-судинної системи регуляторними молекулами та газотрансмітерами зокрема.

Особистий внесок здобувача.

Автором особисто проаналізовано наукову літературу по темі дослідження та у співпраці з науковим керівником чл.-кором НАНУ, д.м.н., професором Сагачем В.Ф. сформульовано мету та завдання роботи. Самостійно проведено дослідження з вивчення акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями, набухання органел за дії донора та інгібітора синтезу сірководню *in vivo*, вивчення показників мітохондріального дихання. Частина дослідження проведена за участю співробітників відділу фізіології кровообігу, зокрема вивчення біохімічних показників окисного стресу з допомогою н.с., к.б.н. Коркач Ю.П. та ст.н.сп., к.б.н. Струтинської Н.А., вивчення показників роботи серця за методом Лангендорфа з допомогою н.с., к.б.н. Гошовської Ю.В., м.н.с. Добровольської Р.А. та Охай І.Ю. Дисертантом особисто проведено аналіз всього обсягу експериментальних даних, їх узагальнення і написання статей, а також представлення результатів на наукових конференціях та з'їздах.

Апробація результатів дисертації. Основні положення й результати дисертації були представлені та обговорені на конференціях та конгресах: Conference for Young Scientists CYS-2015, September 21-25, Kyiv, Ukraine (усна доповідь); Frontiers in cardiovascular biology, Florence, Italy, 08-10 July 2016 (постерна доповідь); XVI читання ім. В.В. Підвисоцького, Одеса, 18-19 травня 2017 року; 42-nd FEBS Congress from Molecules to Cells and Back, 10-14 September, 2017, Jerusalem, Israel (постерна доповідь); ESC Congress 25-29 August, 2018, Munich, Germany (модерована постерна доповідь); Heart Failure 2019 & World Congress on Acute Heart Failure, Athens, Greece from 25 – 28 May 2019 (постерна доповідь); Basic science summer school, organized by ESC, 16-20 June 2019, Nice, France (постерна доповідь).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, у тому числі 6 статей у фахових наукових журналах, рекомендованих ДАК України, 7 – у тезах конгресів, з'їздів, конференцій.

Структура і об'єм дисертації. Дисертація складається зі списку скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень та їх обговорення, заключного розділу і списку використаної літератури

з 176 найменувань. Роботу викладено на 140 сторінці та ілюстровано 30 рисунками і 2 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури детально охарактеризовано сірководень – газоподібну регуляторну молекулу, механізми його синтезу та катаболізму, а також функції та мішені дії у серцево-судинній системі. Наведено характеристику кальцієвого сигналювання у клітинах серця та мітохондріях кардіоміоцитів, а також зроблено акцент на відкритих питаннях щодо регуляції сірководнем кальцієвого гомеостазу та функцій мітохондрій клітин серця у дорослих та старих щурів.

Матеріали і методи досліджень. В експериментах використовували дорослих (віком 5-6 міс.) і старих (22-24 міс.) щурів самців лінії Вістар масою 250-350 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Дослідження проведені з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

Пригнічення ферменту синтезу сірководню 3-MPST здійснювали внутрішньоочеревинним введенням інгібітора о-карбоксиметилгідроксиламіну (О-СМН) у дозі 50 мг/кг за 30 хв до декапітації тварин. Контрольна група тварин – без впливу інгібітора. У кожній серії експериментів було використано не менше ніж 5 щурів.

Реєстрація показників скоротливої функції. Перфузію коронарних судин ізольованого серця щурів здійснювали за методом Лангендорфа [Doring, 1990], ретроградно через аорту в умовах постійного тиску 75-80 мм рт.ст., при 37 °С розчином Кребса-Хензеляйта, який безперервно аерували карбогеном (95% O₂ і 5% CO₂). Методика навантаження ізольованого серця кальцієм передбачала додавання CaCl₂ у перфузійний розчин кожні 10 хв, концентрація якого зростала від 1,7 до 12,5 ммоль/л. За таких умов вивчали зміни показників скоротливої активності ізольованого серця на тлі блокади ферменту синтезу сірководню 3-MPST інгібітором О-СМН. Як контроль використовували серця нативних тварин.

Тиск у порожнині лівого шлуночка (Рлшл) та його першу похідну (dP/dtmax і dP/dtmin), кінцевий діастолічний тиск (КДТ) та частоту серцевих скорочень (ЧСС) вимірювали за допомогою латексного балончика тензодатчиком 746 («Мінгограф-82», «Eleva», Швеція) і реєстрували на комп'ютері, використовуючи програмне забезпечення Global Lab. Коронарний потік оцінювали як об'єм перфузійного розчину, який відтікав від серця за 1хв. Інтенсивність скоротливої функції серця (ІСФ) – вираховували як добуток Рлшл та частоти серцевих скорочень.

Виділення мітохондрій та реєстрація відкривання мітохондріальної пори. Виділення мітохондрій здійснювали методом диференційного

центрифугування у нашій модифікації [Sagach, 2004]. Для цього серця тварин ретельно промивали охолодженим 0,9 %-м розчином KCl (2-4°C), подрібнювали та гомогенізували у 9-кратному об'ємі середовища такого складу: (ммоль/л): KCl – 120, тріс – HCl – 25, KH_2PO_4 – 3; pH 7,2. Гомогенат центрифугували двічі при 700 і 11000g (4°C). Отриманий осад (мітохондріальна фракція) ресуспендували в буфері і одразу використовували в дослідях. Одержану суспензію мітохондрій зберігали при 2 °C. Концентрацію білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [Lowry, 1951].

Для дослідження відкривання МП ізольовані органели поміщали в інкубаційне середовище (кінцевий об'єм – 3 мл) і за допомогою спектрофотометра реєстрували зниження оптичної щільності при $\lambda=520$ нм протягом 15 хв. Концентрація білка становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію нативних мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора МП – Ca^{2+} .

Вивчення акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями. Для дослідження акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями, органели навантажували флуоресцентним зондом Fluo-4 AM у концентрації 2,5 мкмоль/л протягом 30 хв при 26 °C. Для покращення процесу навантаження барвник змішували з Pluronic F-127 (0,02%-й), як описано у протоколі навантаження для Fluo-3 AM. Виміри здійснювали у середовищі інкубації. Вимірювання флуоресценції проводили до внесення розчину CaCl_2 у середовище інкубації (вихідні значення) і після – на 1, 3, 5, 7, 9, 11 та 23-й хвилині. Отримані результати представлено як F/F_0 .

Накопичення кальцію мітохондріями реєстрували на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XLTM («Beckman Coulter», США) з аргонним лазером, який дає змогу якісно та кількісно досліджувати біологічні і фізичні властивості клітин і субклітинних структур.

Вивчення мембранного потенціалу виділених мітохондрій. Для дослідження мітохондріального потенціалу методом, запропонованим Брандом, органели інкубували в середовищі ізотонічного складу [Brand, 1995]. У герметичну термостатовану камеру (37°C), обладнану TPMP-селективним електродом (від англ. triphenylmethylphosphonium sensitive electrode) і електродом Кларка, вносили мітохондрії з розрахунку 0,5 мг/мл білка. Роботу першого комплексу дихального ланцюга блокували ротеноном ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/л), а АТФ-синтази – олігоміцином (10^{-7} моль/л). Для ініціації дихання вносили сукцинат натрію (5 ммоль/л). Поглинання кисню суспензією мітохондрій реєстрували за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk 2 (Данія), а зміни концентрації TPMP – pH-метра PP-25 «Sartorius» (Німеччина). Мембранний потенціал мітохондрій розраховували за рівнянням Нернста, приймаючи значення внутрішнього об'єму мітохондрій за 0,65 мкл/мг білка [Borutaite, 1995].

Дослідження мітохондріального дихання за допомогою системи Oxygraph+. Процеси мітохондріального дихання досліджували, використовуючи полярографічний метод та прилад “Oxygraph+” («Hansatech instruments», Великобританія). Функціональний стан мітохондрій оцінювали за показниками Чанса [Chance, 1955]. Як субстрати використовували сукцинат натрію (5 ммоль/л) та L-глутамат (5 ммоль/л). Дихання стимулювали додаванням до суспензії мітохондрій 200 мкмоль/л АДФ. При цьому розраховували швидкість нестимульованого дихання (V_2), швидкість АДФ-стимульованого (V_3) та контрольованого дихання (V_4 ; за відсутності АДФ), дихальний контроль за Чансом (V_3/V_4) та за Ларді (V_3/V_2), коефіцієнт ефективності окисного фосфорилування (АДФ/О). Всі показники представлено у перерахунку на 1 мг білка.

Біохімічні методи. Вміст H_2S визначали таким чином: до аліквот проб додавали 0,5 мл 1%-го розчину ацетату цинку, інкубували при $37,5^\circ C$ протягом 10 хв, далі вносили 0,5 мл 20 ммоль/л розчину N,N-DPD (диметил-п-фенілендіамін) та 0,5 мл 30 ммоль/л розчину $FeCl_3$. Після 10 хв інкубації в темряві на холоді визначали оптичну густину при $\lambda = 670$ нм [Svenson, 1980]. Активність різних ізоферментів NOS, як нітрозативної компоненти окисного стресу, Ca^{2+} -незалежної iNOS та Ca^{2+} -залежної cNOS визначали за утворенням L-цитруліну, фіксуючи оптичну густину інкубаційної суміші при $\lambda = 492$ нм. Активність cNOS розраховувалася за наявності 2 ммоль/л Ca^{2+} , iNOS – 5 ммоль/л EDTA. Активність ферментів виражалася у пікомолях новоутвореного L-цитруліну протягом 1 хвилини на 1 мг загального білка в пробі [Boyde, 1980]. Методика визначення вмісту дієнових кон'югатів (ДК) включала екстракцію ліпідів зі зразків за допомогою органічних розчинників (гептан/ізопропанол 1:1) і зміни екстинції при $\lambda = 232$ нм [Gavrilov, 1988]. Вміст малонового діальдегіду (МДА) в мітохондріях серця визначали, змішуючи 0,5 мл 1%-го розчину ТБК в 50 ммоль/л NaOH і 0,5 мл 2,8%-го розчину трихлороцтової з аліквотою проб. Суміш кип'ятили 20 хв на водяній бані, охолоджували, центрифугували і вимірювали величину екстинції при $\lambda = 532$ нм. Вміст МДА розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинції $15600 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [Mihara, 1978].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Вплив пригнічення мітохондріального шляху синтезу сірководню на скоротливу функцію серця та рівень окисного стресу. Застосувавши інгібітор ферменту 3-MPST О-СМН *in vivo* у дозі 50 мг/кг за 30 хв до декапітації виявили зниження вмісту H_2S не лише в мітохондріях, а й у плазмі крові дослідних тварин (рис. 1, а, б) на 25 та 45 % відповідно. Таким чином, ми довели ефективність обраного інгібітора та його адекватність для застосування у наших дослідженнях. Фермент 3-MPST знаходиться як в мітохондріях, так і цитоплазмі клітин. У плазму крові сірководень, ймовірно, за все, потрапляє з цитоплазми ендотеліальних клітин судин. І хоча ми говоримо про фермент 3-MPST як про мітохондріальний,

зниження вмісту сірководню у плазмі крові внаслідок введення інгібітора свідчить про важливу роль цього ензиму для синтезу H_2S загалом, а не лише в мітохондріях. Отже, ми відтворили модель часткового дефіциту ендogenous синтезу сірководню, що подібно до стану при старінні, де спостерігали пригнічення його продукції.

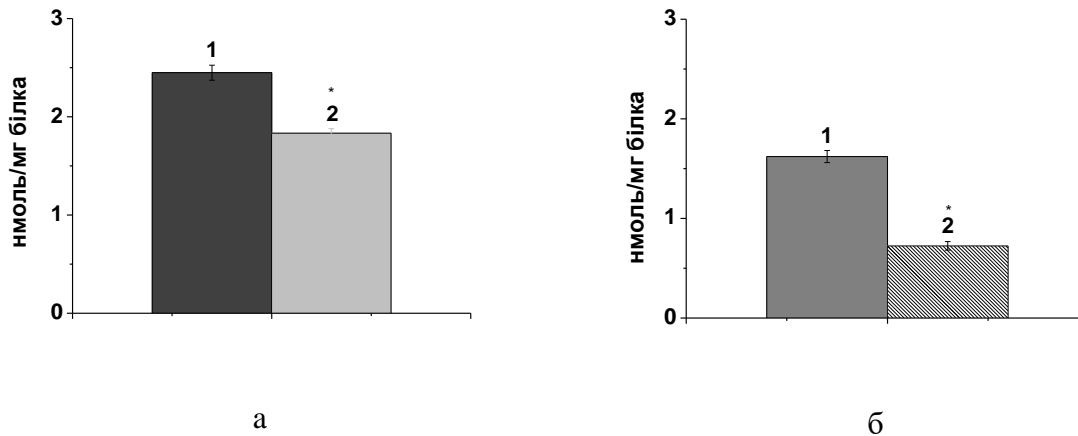


Рис. 1. Вміст H_2S в мітохондріях серця (а) та плазмі крові (б) контрольних (1) та дослідних (2) щурів (дія *in vivo* О-СМН у дозі 50 мг/кг); * $P \leq 0,05$ відносно контролю

Застосування інгібітора О-СМН *in vivo* мало також негативний вплив на показники кардіодинаміки ізольованого серця дорослих щурів (таблиця). Так, удвічі знижувалися тиск у лівому шлуночку (Рлшл) та швидкість скорочення і розслаблення (dP/dt) міокарда, а коронарний потік зменшувався на 11,8 %. Спостережувані зміни були вірогідними. Незважаючи на те, що значення ЧСС мали тенденцію до зростання, робота серця (ІСФ) у тварин після введення блокатора 3-MPST залишалася вдвічі нижчою, ніж в інтактних щурів.

Відомо, що такий патологічний процес, як серцева недостатність, характеризується зниженням насосної функції серця та дефектами спряження процесу збудження-скорочення через окисний стрес та порушення гомеостазу кальцію в кардіоміоцитах. Також з'ясовано, що за серцевої недостатності підвищується концентрація Ca^{2+} в клітинах, що призводить до посиленого входу катіона в мітохондрії, відкривання МП, розсіювання мітохондріального мембранного потенціалу, порушення роботи дихального ланцюга, зниження вмісту АТФ тощо.

Таблиця. Вплив інгібітора ферменту 3-MPST на показники кардіодинаміки ізольованого серця щурів ($M \pm m$)

Показник	Контроль (n=6)	О-СМН (n=5)
----------	-------------------	----------------

Тиск у лівому шлуночку, мм рт. ст.	107 ±10	48 ± 6**
Максимальна швидкість скорочення, мм рт. ст./с	2043 ± 194	968 ± 107*
Максимальна швидкість розслаблення, мм рт. ст./с	1887 ±202	920 ± 115*
Коронарний потік, мл/хв	7,6 ± 0,3	6,7 ± 0,2*
Частота серцевих скорочень , хв ⁻¹	200 ± 13	217 ± 13
Інтенсивність скоротливої функції, мм рт. ст. хв. ⁻¹	22434±3021	11671±1754*

* P<0,05, ** P<0,01 відносно контролю

Раніше нами було показано, що екзогенне введення донора сірководню (NaHS) має позитивний ефект на гетерометричну регуляцію роботи ізольованого серця щурів, а також запобігає розвитку реперфузійних порушень скоротливої активності міокарда, що пов'язано з його перевантаженням кальцієм [Shymans'ka, 2012]. Крім того було виявлено, що однією з мішеней кардіопротекторної дії донора сірководню є МП [Shimanskaia, 2013], яка бере участь у запуску апоптозу/некрозу і розвитку різноманітних захворювань серцево-судинної системи [Halestrap, 2009]. Це спонукало нас зробити висновок про регуляторний вплив сірководню на кальцієвий обмін у клітинах кардіоміоцитів.

Послідовно збільшуючи концентрацію CaCl_2 у перфузійному розчині, і, відтворюючи, таким чином, модель кальцієвого навантаження, досліджували адаптаційні можливості міокарда у тварин з пригніченим синтезом сірководню. Показано, що серця дослідних тварин розвивали менш потужну реакцію, яка проявлялась у знижених значеннях Рлшл, скорочувальної активності, КП та ІСФ міокарда (рис. 2). Також слід зазначити, що максимальна інотропна стимуляція серця у контрольних тварин спостерігалася у відповідь на додавання 7,5 ммоль/л CaCl_2 , тоді як у дослідних – при 5 ммоль/л CaCl_2 (див. рис. 2. г). Це свідчить про зниження функціональних резервів міокарда у тварин за умов пригнічення синтезу сірководню мітохондріальним ферментом.

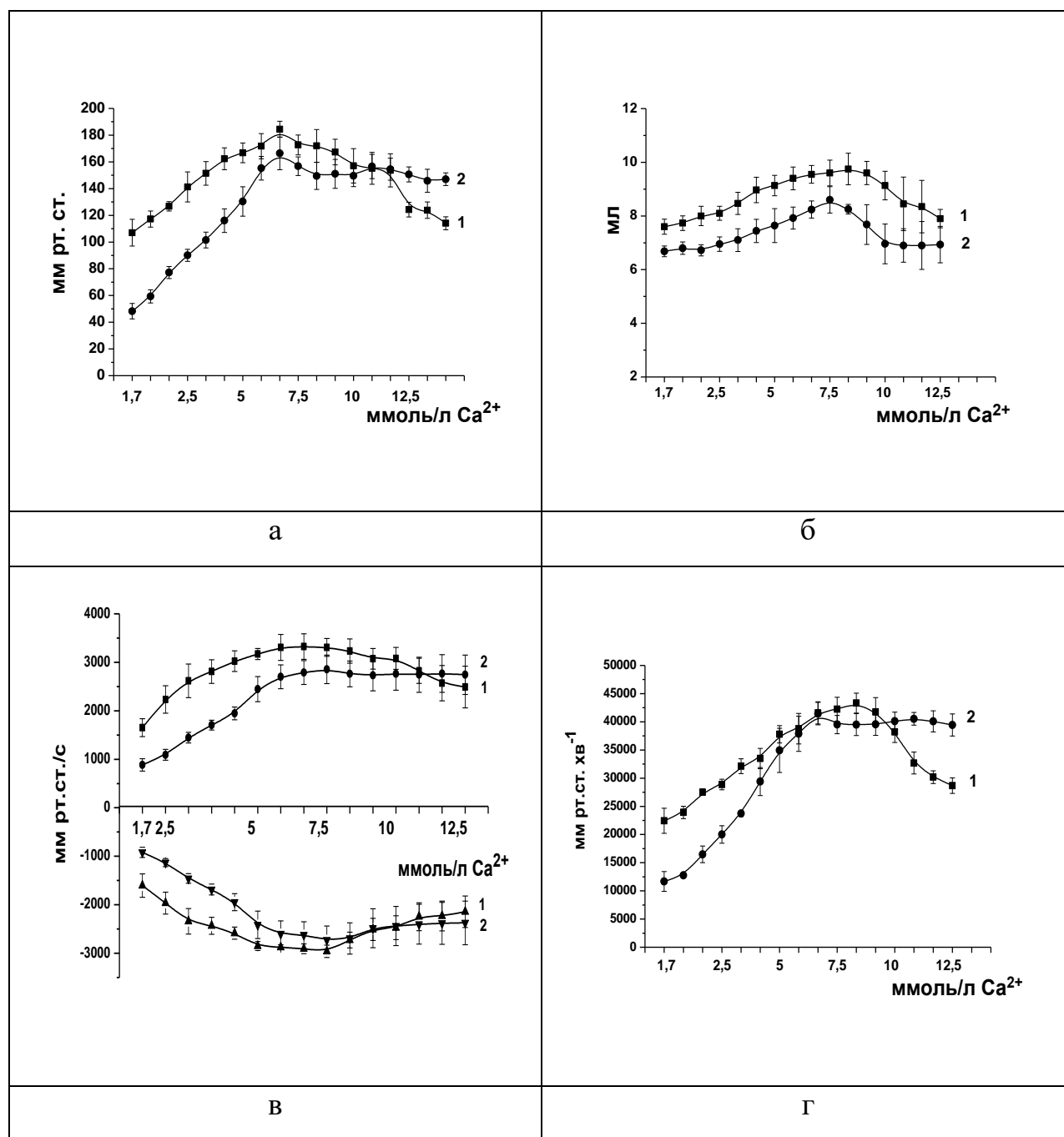


Рис. 2. Вплив О-СМН на показники кардіодинаміки ізолюваного серця щурів за умов збільшення концентрації кальцію у перфузійному розчині: а – тиск у лівому шлуночку; б – коронарний потік; в – швидкість скорочення і розслаблення міокарда dP/dt ; г – інтенсивність скоротливої функції ІСФ; 1 – контроль, 2 – дія *in vivo* О-СМН у дозі 50 мг/кг

Як відомо, внаслідок перевантаження внутрішнього вмісту клітини кальцієм, його концентрація зростає у саркоплазматичному ретикулумі, цитоплазмі та мітохондріях. Це призводить до електричних та механічних порушень у роботі

серця, зокрема до аритмій, зниження скоротливої функції, розвитку контрактур та післяконтрактур [Vassalle, 2004]. Водночас зниження скоротливої сили пов'язане зі зменшенням кількості високоенергетичних фосфатів. Таке зростання концентрації Ca^{2+} в клітинах серця може бути наслідком пролонгованої тахікардії, підвищеним вивільненням катехоламінів, порушенням функцій клітин (при ішемії, гіпоксії, реперфузії, серцевій недостатності) тощо [Vassalle, 2004].

Отже, пригнічення синтезу сірководню в клітинах призводить до зниження здатності серця витримувати кальцієві навантаження. Оскільки раніше було показано, що за різних патологічних станів, зокрема при старінні та гіпертензії, вміст H_2S в тканинах серця та мітохондріях знижується, то відтак серце стає більш чутливим до ішемічно-реперфузійного пошкодження [Strutynska, 2016].

Відомо, що сірководень має антиоксидантні властивості. Тому зниження його вмісту в тканинах та крові ймовірно впливає на рівень АФК та АФА. Функціональним проявом H_2S у серцево-судинній системі є підвищення активності антиоксидантних ферментів Mn- та CuZn-супероксиддисмутаза, а також пряме захоплення АФК у клітинах кардіоміоцитів під час ішемії-реперфузії [Shen, 2014]. Виявили, що у дослідних тварин швидкість генерації $\cdot\text{O}^{2-}$ та $\cdot\text{OH}$ -радикалів зростала як в мітохондріях, так і в плазмі крові, що свідчить про інтенсифікацію процесів утворення вільних радикалів (рис. 3. а, б).

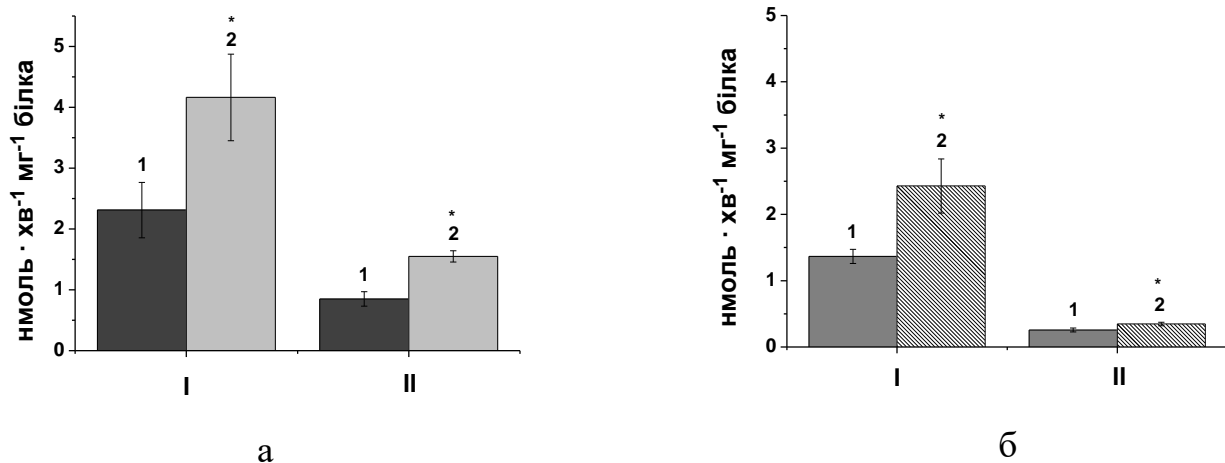


Рис. 3. Значення показників окисного стресу у мітохондріях серця та плазмі крові контрольних (I) та дослідних (2) щурів: швидкість генерації супероксидного (I) та гідроксильного (II) радикалів у мітохондріях (а) та плазмі крові (б); * $P \leq 0,05$ відносно контролю

Підвищення вмісту супероксидного радикала, яке супроводжується значним утворенням NO (за допомогою iNOS), призводить до зростання продукції

пероксинітриту – надзвичайно потужного окисника. У наших дослідженнях показано, що пригнічення *in vivo* синтезу сірководню спричиняє достовірне зниження активності роботи cNOS у мітохондріях (mtNOS) та в плазмі крові на 20,4 та 24,6 % відповідно (рис. 4 а, б). При цьому активність індуцибельного синтезу NO в органелах зростає у 3,27 раза, що свідчить про значне підвищення утворення NO, який, ймовірно, надалі бере участь у синтезі пероксинітриту.

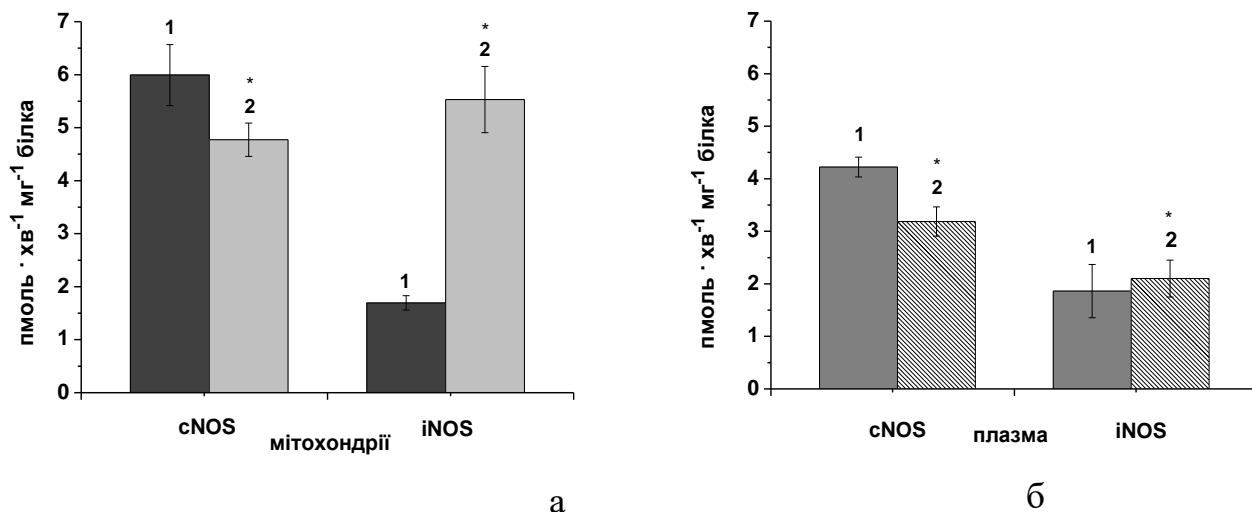


Рис. 4. Активність ферментів *de novo* синтезу NO, а саме конститутивної (cNOS) та індуцибельної (iNOS) NO-синтаз в мітохондріях серця (а) та плазмі крові (б) контрольних (1) та дослідних (2) щурів відповідно; * $P \leq 0,05$ відносно контролю

Відомо, що одним із механізмів дії сірководню як антиоксиданта є зниження перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) через зв'язування H_2O_2 та супероксидного радикала у моделі ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда [Szabó, 2007]. Також показано, що активація сірководнем Nrf2-залежного шляху призводить до підвищення експресії генів гемоксигенази (HO-1), глутатіонредуктази, глутатіон-S-трансферази, тіоредоксину та каталази, які відіграють важливу роль в антиоксидантній системі захисту, а також його інгібувальний вплив на фосфодіестеразу-5 та пряму дію як скавенджера цитотоксичного пероксинітриту [Shen, 2014]. У наших дослідженнях інтенсивність ПОЛ оцінювали за зміною вмісту первинних продуктів окиснення – ДК та кінцевого продукту – МДА. Виявили, що незважаючи на відсутність достовірної різниці у концентрації продуктів ПОЛ у мітохондріях, їх вміст вірогідно зростає у плазмі крові, що вказує на інтенсифікацію цього процесу (рис. 5, а, б).

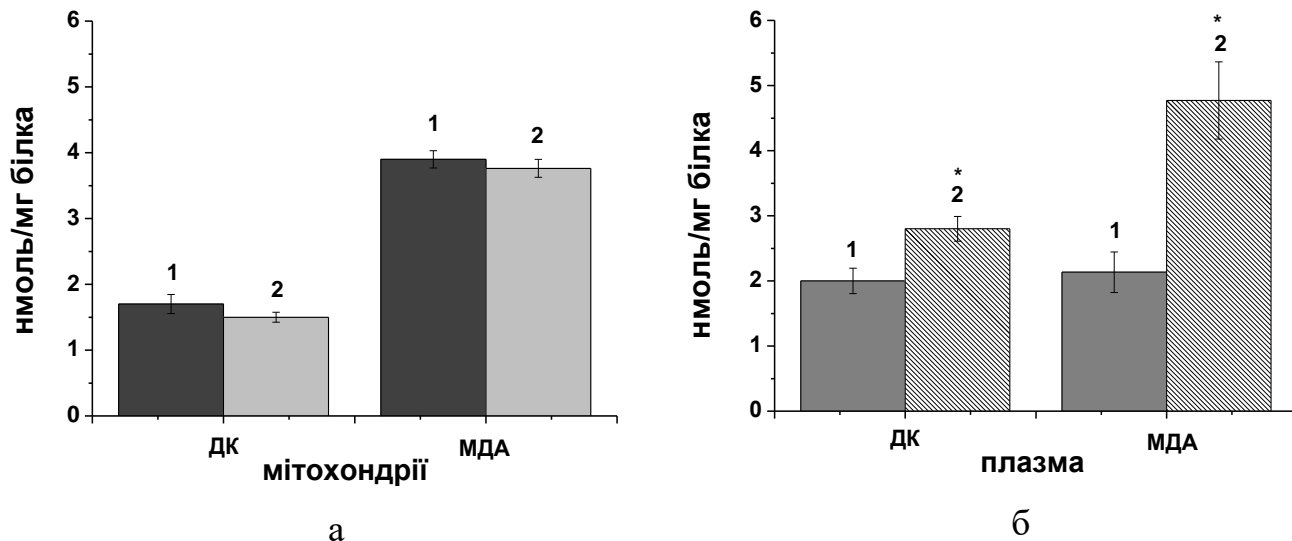


Рис. 5. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів (ДК) та малонового діальдегіду (МДА) в мітохондріях серця (а) та плазмі крові (б) контрольних (1) та дослідних (2) щурів; * $P \leq 0,05$ відносно контролю

Таким чином показано, що пригнічення ендогенного синтезу сірководню в мітохондріях призводило до зростання таких показників окисного стресу, як $\cdot\text{O}^-$ та ОН-радикалів, підвищення ПОЛ і збільшення активності індукцибельного синтезу NOS на тлі зменшення функціональної активності cNOS як в мітохондріях серця (mtNOS), так і в плазмі крові дослідних щурів.

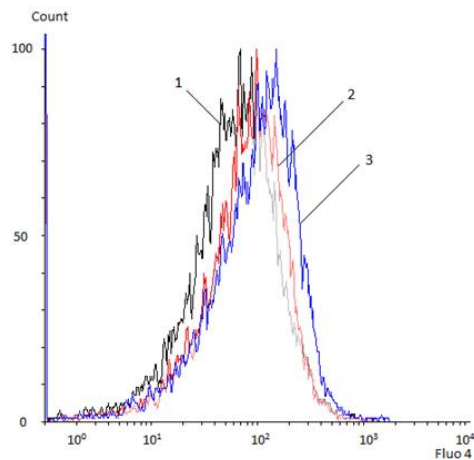
2. Вплив сірководню на накопичення кальцію в ізольованих мітохондріях серця щурів. Вплив екзогенного сірководню на акумуляцію кальцію в ізольованих мітохондріях вивчали, використовуючи NaHS у діапазоні концентрацій від 10^{-7} до 10^{-4} моль/л. Вимірювання флуоресценції проводили до та через хвилину після внесення розчину NaHS, а також після додавання CaCl_2 у середовище інкубації на 1, 3, 5, 7, 9, 11-й хвилини. Також використовували інгібітор мітохондріального ферменту синтезу сірководню O-CMN у концентрації 10^{-3} моль/л.

Під час вивчення впливу H_2S на накопичення кальцію ізольованими мітохондріями, використовували Ca^{2+} у різних концентраціях, зокрема 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ і 10^{-4} моль/л, що становило 0.2, 1 і 2 мкмоль/мг мітохондріального білка. Акумуляція катіона органами відбувалася за умов його внесення у концентрації $5 \cdot 10^{-5}$ і 10^{-4} моль/л, про що свідчить підвищення флуоресценції кальційчутливого барвника Fluo-4 АМ максимально на 46 %. При додаванні у середовище інкубації 10^{-5} моль/л Ca^{2+} зростання флуоресценції не спостерігалось. Тому у подальших дослідженнях

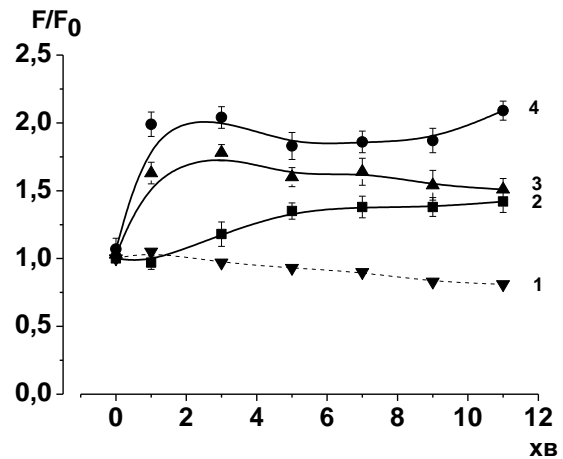
ізолювані органели навантажували ефективними концентраціями катіона, які призводили до посилення флуоресцентного сигналу (див. рис. 6).

Вплив донора сірководню на накопичення кальцію у мітохондріях був неоднозначним (рис. 6. б). Так, у високій концентрації NaHS (10^{-4} моль/л) частково пригнічував акумуляцію катіона, про що свідчить зниження флуоресценції на 25 % (не представлено на рисунку).

Подібний ефект спостерігали за дії 10^{-5} моль/л NaHS. Натомість преінкубація мітохондрій з 10^{-6} моль/л NaHS стимулювала накопичення кальцію в ізолюваних, навантажених цим катіоном мітохондріях (рис. 6, крива 3), в 1,68 раза на 1-й хвилині. Найбільш ефективно NaHS підвищував цей процес в органелах у концентрації 10^{-7} моль/л: інтенсивність флуоресценції підвищувалася вдвічі (див. рис. 6, крива 4). Варто зазначити, що дія лише NaHS (10^{-7} моль/л) у середовищі, без додавання кальцію, не впливала на зміну значення цього показника.



а



б

Рис. 6. а. Нативні криві інтенсивності флуоресценції Fluo-4 АМ в мітохондріях без Ca^{2+} (1), при дії Ca^{2+} (10^{-4} моль/л) (2) та за умов преінкубації з NaHS протягом 1 хв (10^{-7} моль/л) на тлі дії Ca^{2+} (10^{-4} моль/л) (3); б. Вплив донора сірководню NaHS на акумуляцію кальцію у мітохондріях серця щурів: 1 – середовище інкубації містить слідові концентрації Ca^{2+} ; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3 – преінкубація з NaHS (10^{-6} моль/л) і дія Ca^{2+} ; 4 – преінкубація з NaHS (10^{-7} моль/л) і вплив Ca^{2+}

Отже, вплив донора сірководню на кальційакумулювальну здатність ізолюваних мітохондрій був дозозалежним, при цьому NaHS у концентрації 10^{-7} моль/л найбільш ефективно сприяв входу Ca^{2+} в органели. Отриманий результат свідчить про важливу роль H_2S в регуляції кальцієвого гомеостазу в клітинах серця, оскільки для розслаблення серцевого м'яза потрібно, щоб кальцій був вилучений з цитозолу, а мітохондрії належать до органел, які його депонують. Дані про те, що

сірководень знижує перевантаження цитоплазми клітин судин і серця кальцієм, підтверджені також в інших дослідженнях [Pan, 2008, Chen 2012].

Водночас активне надходження Ca^{2+} в мітохондрії може викликати відкривання МП – мегаканалу між внутрішньою і зовнішньою мітохондріальними мембранами. У попередніх дослідженнях нами було показано, що донор сірководню у концентраціях 10^{-6} - 10^{-5} моль/л пригнічував кальційіндуковане відкривання МП. До механізмів такого інгібувального впливу H_2S може належати як його безпосередня дія на структурні елементи МП, так і активація мітохондріальних K_{ATP} -каналів та утворення NO, який у свою чергу також запобігає відкриванню МП [Strutynska, 2011]. Так, встановлено, що активація H_2S -синтезувальних ферментів у старих тварин сприяла відновленню конститутивного синтезу NO в тканинах серця та аорти [Mys, 2017], який є зниженим при старінні, що підтверджує взаємний регуляторний вплив газових трансмітерів один на одного та їхню функціональну взаємодію. Тобто зростання кальційакумулювальної здатності мітохондрій у результаті впливу NaHS може бути наслідком інгібування сірководнем МП, яка бере участь також і у фізіологічній регуляції вмісту катіона в органелах.

Використовуючи тотожні концентрації NaHS при дослідженні накопичення Ca^{2+} мітохондріями та індукції МП, ми показали, що донор сірководню у концентрації 10^{-6} моль/л, що відповідало 20 нмоль/мг білка, підвищував акумуляцію кальцію в мітохондріях максимально на 3-й хвилині на 72 % (рис. 6, крива 3). Цей ефект супроводжувався попередженням Ca^{2+} -індукованого відкривання МП: внаслідок дії NaHS у концентрації 10^{-5} моль/л, що становило 25 нмоль/мг білка (рис. 8, крива 4). Таке посилення акумуляції кальцію мітохондріями при їх навантаженні катіоном може бути одним із механізмів вазодилататорного впливу сірководню у різних судинах організму.

Також досліджували участь ендогенного сірководню у регуляції кальцієвого гомеостазу мітохондрій. За умов преінкубації суспензії органел з інгібітором мітохондріального ферменту синтезу сірководню O-CMN (10^{-3} моль/л) вірогідно знижувалась акумулювальна і, ймовірно, кальцієва ємність мітохондрій, що проявлялось у зниженні вмісту кальцію в мітохондріях до кінця експерименту.

Старіння характеризується прогресивною втратою функцій органами, що призводить до розвитку дегенеративних розладів та виникнення апоптозу в клітинах [Di Lisa, 2005, Ziegler, 2015]. Дещо суперечливими є дані щодо функціонування дихального ланцюга за умов фізіологічного старіння. Зокрема дослідники стверджують, що незважаючи на прогресуюче окиснення ліпідів, активність комплексів ЕТЛ органел з віком не змінюється [Di Lisa, 2005]. Інші науковці спостерігають зниження ефективності роботи дихального ланцюга у щурів у разі старіння [Duicu OM, 2013]. Також раніше нами було показано, що з віком чутливість МП до кальцію зростає [Sagach, 2004]. Ми виявили, що накопичення Ca^{2+} мітохондріями серця старих тварин відбувається активніше

порівняно з дорослими. Так, у них максимальна флуоресценція барвника спостерігалася вже на 3-й хвилині і була вищою на 27 %, ніж у контрольних дорослих. Ймовірним механізмом підвищення входу катіона є окиснення структур мітохондріального уніпортера з віком, який є основним воротарем входу Ca^{2+} [Dong, 2017].

При дослідженні впливу донора сірководню на накопичення кальцію в мітохондріях серця старих щурів виявили, що NaHS посилює вхід катіона в органели у концентраціях 10^{-6} і 10^{-7} моль/л максимально на 14 і на 22 % відповідно.

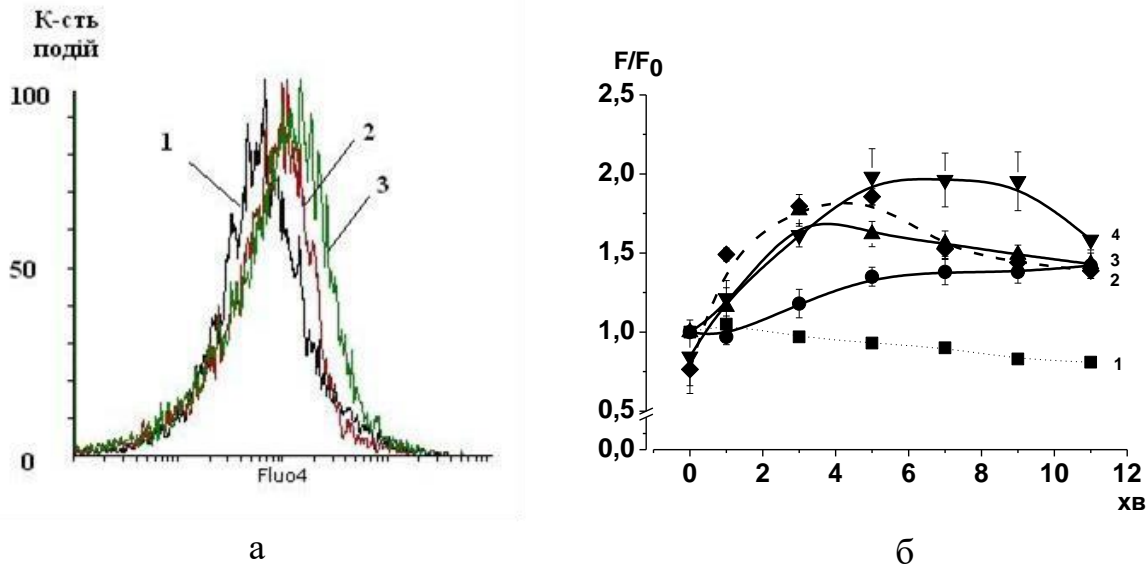


Рис. 7. Вплив донора сірководню NaHS на акумуляцію кальцію у мітохондріях серця старих щурів: а. нативні криві інтенсивності флуоресценції Fluo-4 AM; б. кінетичні криві флуоресценції: 1 – середовище інкубації містить слідові концентрації Ca^{2+} ; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3 – преінкубація з NaHS (10^{-6} моль/л) і дія Ca^{2+} ; 4 – преінкубація з NaHS (10^{-7} моль/л) і вплив Ca^{2+}

Отже, екзогенний сірководень стимулював акумуляцію кальцію в мітохондріях лише в низьких досліджуваних концентраціях, а підвищення концентрації H_2S вище фізіологічних пригнічувало накопичення катіона. Інгібування ендогенного синтезу H_2S не сприяло акумуляції кальцію мітохондріями, що вказує на регулювання Ca^{2+} -транспортуючих систем органел за фізіологічних умов.

3. Вплив інгібування мітохондріального ферменту синтезу сірководню 3-MPST *in vitro* та *in vivo* на чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} у серці щурів. У попередніх роботах було показано, що екзогенний сірководень у концентраціях 10^{-6} - $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л попереджав кальційіндуковане відкривання МП, що свідчить про його протекторний вплив на пороутворення в серці дорослих і

старих щурів [Strutynska, 2011]. Проте недосліджено роль ендogenous сірководню, який синтезується в мітохондріях на регуляцію кальцієвого гомеостазу в цих органелах.

Ми дослідили, що преінкубація ізольованих мітохондрій з вищезгаданим інгібітором О-СМН підвищує амплітуду кальційіндукованого набухання органел на 20 % (рис. 8, крива 3) порівняно з дією кальцію (10^{-4} моль/л; рис. 8, крива 2). У цій серії експериментів також було використано NaHS (10^{-5} моль/л) *in vitro*, який запобігав на 51 % набухання мітохондрій серця дорослих щурів на тлі дії кальцію (крива 4). Попередня інкубація органел з О-СМН зменшувала протекторний вплив сірководню на 20 % (крива 5).

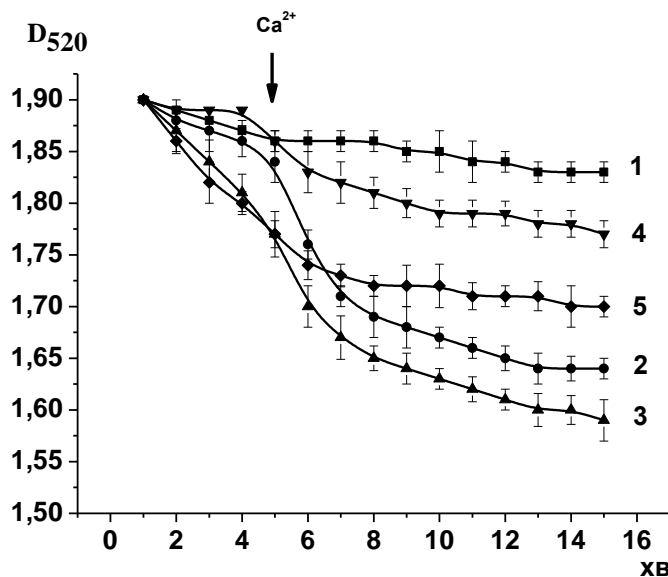


Рис. 8. Дія NaHS та інгібітора синтезу H_2S О-СМН на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця дорослих щурів: 1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3 – вплив О-СМН *in vitro*, 10^{-3} моль/л і дія Ca^{2+} ; 4 – преінкубація з NaHS (10^{-5} моль/л) і дія Ca^{2+} ; 5 – преінкубація з NaHS, дія Ca^{2+} і О-СМН

Отже, за умов інгібування ендogenous синтезу H_2S в мітохондріях зростала ймовірність відкриття циклоспорин А-чутливої МП, внаслідок дії внутрішньомітохондріального кальцію чи, можливо, посиленого утворення АФК чи АФА в мітохондріях, як було показано вище.

Раніше ми показали, що пригнічення синтезу сірководню в клітинах серця щура *in vivo* призводило до зниження здатності серця витримувати кальцієві навантаження. Тому ми припустили, що одним з механізмів цього при інгібуванні мітохондріального шляху синтезу H_2S є саме відкриття МП. На рис. 9 показано вплив О-СМН *in vivo* (50 мг/кг) на чутливість МП до Ca^{2+} .

Встановлено, що дефіцит H_2S мітохондріального походження спричиняє зниження порога чутливості до кальцію та значного підвищення амплітуди набухання мітохондрій за його дії у концентрації 10^{-4} моль/л. В експериментах *in vitro* з використанням цього інгібітора виявлено, що його вплив на набухання мітохондрій залежав від концентрації. Найбільш активно, на 44 %, О-СМН підвищував амплітуду набухання мітохондрій у концентрації 10^{-3} моль/л. За дії нижчих концентрацій (10^{-4} та 10^{-5} моль/л) вона збільшилася на 20 та 17,8 %

відповідно. При застосуванні О-СМН на старих щурах, на тлі зниженого вмісту у них H_2S посилення процесів пороутворення.

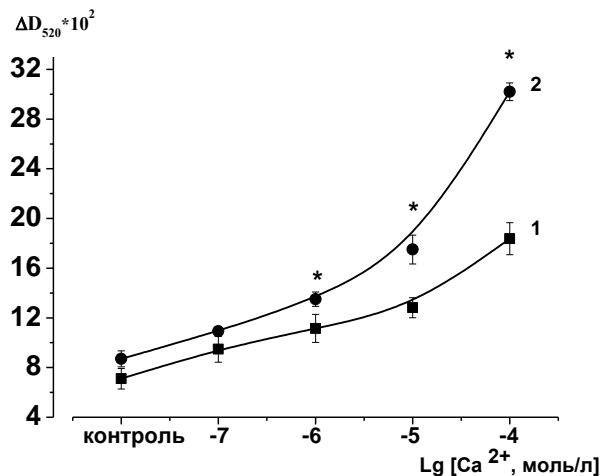


Рис. 9. Вплив О-СМН на динаміку набухання мітохондрій: 1 – контроль, 2 – дія *in vivo* О-СМН (50 мг/кг); * $P \leq 0,05$ відносно контролю

Таким чином, сірководень, що ендогенно синтезується в мітохондріях, регулює відкривання кальційіндукованої МП, знижуючи її чутливість до індуктора.

4. Вплив пригнічення *in vivo* мітохондріального ферменту синтезу сірководню на функціональний стан дихального ланцюга мітохондрій серця щурів. Відомо, що в результаті роботи дихального ланцюга клітини серця отримують 90 % енергії, потрібної для скорочення серцевого м'яза. Вище ми зазначали, що застосування інгібітора мітохондріального ферменту синтезу сірководню *in vivo* призводило до зниження вихідних показників кардіодинаміки ізолюваного серця дорослих щурів, а також зменшувало функціональні резерви міокарда за умов кальцієвих навантажень. Зниження функціональних показників роботи серця може бути зумовлено порушенням роботи мітохондрій кардіоміоцитів. Тому ми використали О-СМН (50 мг/кг) і дослідили функціональний стан органел. Виявили, що при застосуванні *in vivo* О-СМН значно погіршувалася робота дихального ланцюга, що проявлялося у зниженні швидкості дихання (рис. 10).

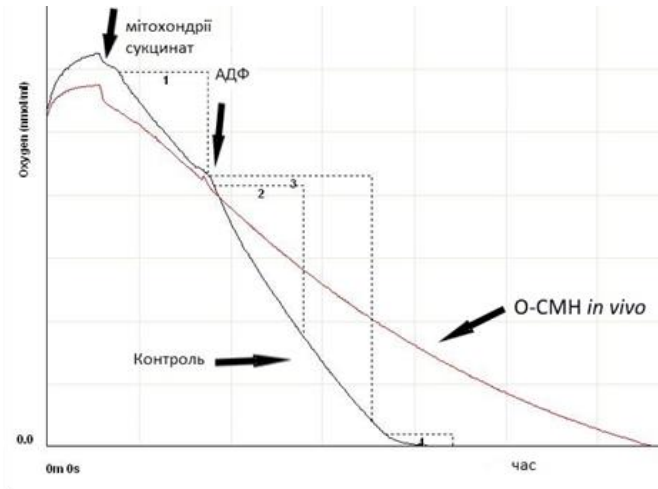


Рис. 10. Нативні криві споживання кисню мітохондріями серця дорослих щурів та органелами з пригніченим синтезом H_2S

При цьому зменшувалася швидкість споживання кисню у стані V_2 та достовірно знижувалася швидкість АДФ-стимульованого дихання V_3 . З рис. 11 видно, що за дії інгібітора не спостерігали чіткого перелому кривої у стані V_4 , коли вичерпується АДФ, що свідчить про знижену функціональну здатність мітохондрій серця дослідних тварин. Значення дихального контролю за Чансом та Ларді, які характеризують ефективність роботи дахального ланцюга мітохондрій також відповідно знижувалися у 1,32 та 1,29 раза (рис. 11, б). Також достовірно зменшувалося значення АДФ/О, що характеризує спряження процесів окиснення і фосфорилування у мітохондріях (рис. 11, в).

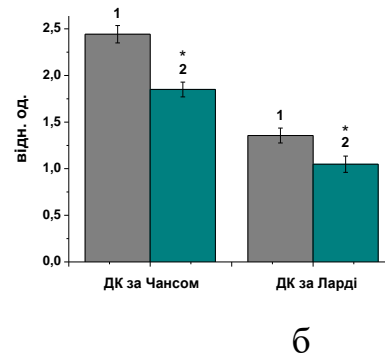
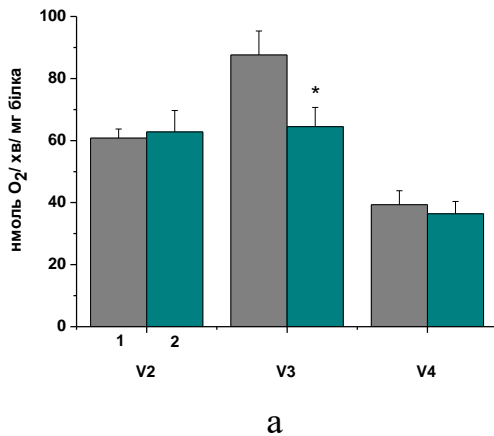
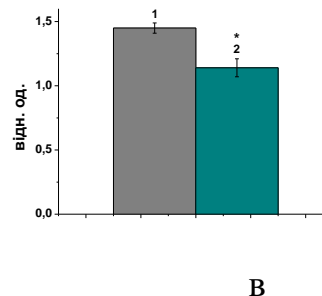


Рис. 11. а. Швидкість споживання кисню мітохондріями серця щурів у станах V_2 , V_3 , та V_4 за Чансом; б. Дихальний контроль за Чансом (V_3/V_4) та за Ларді V_3/V_2 ; в. значення показника АДФ/О у суспензії ізольованих мітохондрій серця: 1 – контроль, 2 – введення *in vivo* О-СМН, (50 мг/кг)



Отже, введення інгібітора мітохондріального шляху синтезу сірководню погіршувало функціональну здатність електронно-транспортного ланцюга, що проявлялася у зниженні швидкості споживання кисню у станах V_2 , V_3 та V_4 , а також показників дихального контролю та АДФ/О. Це, ймовірно, є однією з головних причин погіршення функціональної роботи серця, зокрема зниження тиску лівого шлуночка (Рлшл), dP/dt_{max} і dP/dt_{min} та коронарного потоку, що було показано нами раніше. Адже, саме ефективність енергетичного забезпечення міокарда, за яку відповідають мітохондрії, є визначальною для роботи серця.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що сірководень регулює кальцієвий гомеостаз у мітохондріях серця щурів. Так, позамітохондріальний сірководень у концентраціях близьких до фізіологічних (10^{-6} і 10^{-7} моль/л) помірно підвищував вхід кальцію в органели у дорослих та старих щурів. При цьому спостерігали H_2S -залежне пригнічення відкривання кальційіндукованої мітохондріальної пори. З іншого боку, зниження вмісту H_2S в самих органелах при інгібуванні його ферменту синтезу або ж в умовах фізіологічного старіння призводило до інтенсифікації вільнорадикальних процесів та порушення роботи серця внаслідок зниження функціонування мітохондрій. Ці результати є доказом мітопротекторної дії газового трансмітера сірководню, який синтезується в першу чергу 3-MPST, і свідчать про регуляцію роботи серця і запобігання патогенних станів.

1. Пригнічення *in vivo* ферменту синтезу сірководню 3-MPST призводило до зменшення вмісту H_2S у мітохондріях серця та плазмі крові щурів. При цьому спостерігали порушення роботи серця, а саме зниження показників кардіодинаміки: Рлшл, dP/dt_{max} і dP/dt_{min} , коронарного потоку та зменшення функціональних резервів міокарда при кальцієвих навантаженнях.
2. Застосування інгібітора H_2S -синтезуючого ферменту спричиняло інтенсифікацію вільнорадикальних процесів, зокрема збільшувало вміст $\cdot O_2^-$ та $\cdot OH$ -радикалів, посилювало ПОЛ та збільшувало активність індукцйбельного синтезу NO на тлі зменшення функціональної активності cNOS як в мітохондріях серця (mtNOS), так і в плазмі крові дорослих щурів. Розвиток оксидативного стресу, який спостерігали в моделі з пригніченим синтезом сірководню, був подібний до такого при старінні.
3. Вперше показано, що сірководень регулює процеси акумуляції кальцію в мітохондріях серця щурів: за дії NaHS у концентраціях (10^{-6} і 10^{-7} моль/л) помірно підвищувався вхід Ca^{2+} в органели, тоді як у високій концентрації NaHS (10^{-4} моль/л) частково пригнічувалася акумуляція катіона. Пригнічення

синтезу H_2S вірогідно знижувало акумулюючу і, ймовірно, кальцієву ємність мітохондрій. Мітохондрії серця старих тварин більш чутливі до високих концентрацій кальцію, процес накопичення іона був інтенсивнішим в часі зі збільшенням на 33 %.

4. Пригнічення ендогенного утворення H_2S *in vivo* знижувало чутливість МП до Ca^{2+} та підвищувало амплітуду набухання мітохондрій серця дорослих щурів *in vitro*. Дія інгібітора 3-MPST на органели старих тварин була більш вираженою.
5. Пригнічення мітохондріального ферменту синтезу сірководню *in vivo* знижувало функціональну активність електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, яка проявлялась у зменшенні швидкості споживання кисню у станах V_2 , V_3 та V_4 , а також показників дихального контролю та АДФ/О за Чансом, що може свідчити про порушення енергетичного забезпечення міокарда.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

В яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Будько А.Ю.**, Струтинська Н.А., Охай І.Ю., Семенихіна О.М., Сагач В.Ф. Накопичення Ca^{2+} у мітохондріях серця щурів за умов підтримання мітохондріального потенціалу. Фізіол. журн. 2015; 61(6): 17-25. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні більшої частини дослідження, статистичній обробці даних та написанні статті).*
2. Струтинська Н.А., Коцюрuba А.В., **Будько А.Ю.**, Мись Л.А., Сагач В.Ф. Порушення функціонування мітохондрій у серці при старінні супроводжується неспряженням конститутивних NO-синтаз на тлі оксидативного та нітрозативного стресу. Фізіол. журн. 2016; 62(2): 3-11. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні частини дослідження, аналізі літератури та написанні частини статті).*
3. **Лучкова А.Ю.**, Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Сірководень підвищує акумуляцію кальцію в мітохондріях та пригнічує відкривання циклоспорин А-чутливої мітохондріальної пори в серці щурів. Фізіол. журн. 2017; 63(3): 9-15. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні дослідження, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*
4. **Лучкова А.Ю.**, Гошовська Ю.В., Федічкіна Р.А., Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Пригнічення мітохондріального шляху синтезу сірководню погіршує скоротливу функцію серця та підвищує чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} у серці щурів. Фізіол. журн. 2017; 63(4): 3-9. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні частини дослідження самостійно та*

активній участі в іншій, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

5. **Лучкова А.Ю.**, Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Вплив іонів кальцію на дихальний ланцюг мітохондрій у серці старих щурів. *Фізіол. журн.* 2018; 64(5):16-25. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальної роботи, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*
6. **Лучкова А.Ю.**, Струтинська Н.А., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Інгібування мітохондріального синтезу сірководню посилює окисний стрес та погіршує роботу електронно-транспортного ланцюга. *Фізіол. журн.* 2018; 64(6):9-16. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні більшої частини дослідження, допомозі у статистичній обробці даних та написанні статті у співпраці з колегами відділу).*

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

7. Semenikhina O, Strutynska N., Chorna S., Budko A., Dosenko V., Sagach V. NO-dependent prevention of mitochondrial permeability transition pore opening by hydrogen sulfide in old rat heart. *FEBS J.* 2014; 281 (Suppl. 1): 359.
8. Alina Budko, N.A. Strutynska, L.A. Mys, O.M. Semenikhina, V.F. Sagach Hydrogen sulfide (H₂S) regulates mitochondrial Ca²⁺ accumulation and prevents permeability transition pore opening in adult rat hearts. Conference for Young Scientists CYS-2015, September 21-25, Kyiv, Ukraine, Abstract book, p. 162.
9. Budko AYU, Strutynska NA, Mys LA, Sagach VF. NO-dependent prevention of permeability transition pore (MPTP) opening by H₂S and its regulation of Ca²⁺ accumulation in adult rat heart mitochondria. *Cardiovascular Research Supplements.* 2016; 111: S56-S81., *Frontiers in cardiovascular biology*, Florence, Italy, 08-10 July 2016.
10. Лучкова А.Ю., Гошовська Ю.В., Струтинська Н.А., Сагач В.Ф. Інгібування мітохондріального шляху синтезу сірководню погіршує скоротливу функцію серця та підвищує чутливість мітохондріальної пори до Ca²⁺ у серці щурів. Бюлетень XVI читань ім. В.В. Підвисоцького, 18 – 19 травня 2017 року.
11. A.Y. Luchkova, L.A. Mys, Y.V. Goshovska, N.A. Strutynska, V.F. Sagach The role of mitochondrial origin H₂S in mitochondrial permeability transition pore opening and cardiac resistance to Ca²⁺ overload in rats. 42-nd FEBS Congress from Molecules to Cells and Back. 10-14 September, 2017, Jerusalem, Israel
12. Luchkova A.Yu., Strutynska N.A., Sagach V.F. Hydrogen sulfide (H₂S) regulates mitochondrial function, Ca²⁺ accumulation and mitochondrial permeability transition pore opening in old rat heart. *European Heart Journal* 39(suppl_1), August 2018. 25-29 August, 2018, Munich, Germany.
13. Luchkova A, Strutynska N, Sagach V. Hydrogen sulfide modulates calcium handling in cardiac mitochondria to maintain their function and helps heart to resist

calcium overload. European Journal of Heart Failure, 21 (Suppl. S1), P. 577 Heart Failure 2019 & World Congress on Acute Heart Failure, Athens, Greece from 25 – 28 May 2019.

АНОТАЦІЯ

Лучкова А.Ю. Роль сірководню (H_2S) у регуляції кальцієвого гомеостазу та функцій мітохондрій серця дорослих і старих щурів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13. – фізіологія людини та тварин. – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі сірководню (H_2S) як ендогенної регуляторної молекули у гомеостазі кальцію в мітохондріях серця дорослих і старих щурів. При застосуванні інгібітора мітохондріального ферменту синтезу H_2S знижувався його вміст у мітохондріях та плазмі крові. При цьому погіршувалися показники кардіодинаміки, зокрема тиск у лівому шлуночку, швидкість скорочення і розслаблення міокарда знижувалися вдвічі, а коронарний потік на 11,8 %. За умов кальцієвих навантажень серця дослідних тварин розвивали менш потужну реакцію, яка проявлялась у знижених значеннях Рлшл, скорочувальної активності, КП та ІСФ міокарда. Максимальна інотропна стимуляція серця у контрольних тварин спостерігалася у відповідь на додавання 7,5 ммоль/л $CaCl_2$, тоді як у дослідних щурів при 5 ммоль/л $CaCl_2$. Це свідчить про зниження функціональних резервів міокарда у тварин за умов пригнічення синтезу сірководню мітохондріальним ферментом. Також з'ясовано, що за умов пригнічення синтезу сірководню зростали показники окисного стресу, такі як супероксидний та гідроксильний радикали, відбувалося посилення переокисного окиснення ліпідів та збільшення активності iNOS, на тлі зменшення функціональної активності cNOS як в мітохондріях серця, так і в плазмі крові дослідних щурів. Вперше виявлено, що екзогенний сірководень (10^{-6} - 10^{-7} моль/л) підвищував вхід Ca^{2+} в мітохондрії серця дорослих та старих щурів в умовах кальцієвого навантаження, при цьому 10^{-5} моль/л NaHS попереджав відкривання мітохондріальної пори в органелах, що свідчить про регуляцію сірководнем транспорту Ca^{2+} у мітохондріях та важливе фундаментальне значення цього відкриття. У той же час пригнічення ендогенного утворення H_2S *in vivo* знижувало поріг чутливості мітохондріальної пори до Ca^{2+} та підвищувало амплітуду набухання мітохондрій серця дорослих та старих щурів за дії інгібітора *in vitro*. В роботі вперше показано, що пригнічення мітохондріального ферменту синтезу сірководню *in vivo* знижувало функціональну здатність електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, яка проявлялась у зменшенні швидкості споживання кисню у станах V_2 , V_3 та V_4 , а також показників дихального контролю та АДФ/О за Чансом. Отже, ендогенний сірководень регулює транспорт кальцію в органелах, виконує

антиоксидантну роль та підтримує роботу електронно-транспортного ланцюга в мітохондріях серця щурів різного віку.

Ключові слова: сірководень, Ca^{2+} , кальцієвий гомеостаз, мітохондріальна пора, дихальний ланцюг, мітохондрії, серце, щури, старіння.

SUMMARY

Luchkova A.Yu. The role of hydrogen sulfide (H_2S) in the regulation of calcium homeostasis and mitochondrial functions in adult and old rats. - Manuscript.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biological Sciences, speciality 03.00.13. - Human and animal physiology. – Bogomolets Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, 2020

The dissertation is devoted to the study of the role of hydrogen sulfide (H_2S) as an endogenous regulatory molecule of calcium homeostasis in the heart mitochondria of adult and old rats. Using the inhibitor of mitochondrial H_2S synthesis enzyme decreased the H_2S content in mitochondria and blood plasma. At the same time cardiodynamic indexes, including left ventricle pressure and the rate of contraction and relaxation of the myocardium were reduced twice, and the coronary flow (CF) by 11.8%. Under conditions of calcium loading, the hearts of experimental animals developed weaker reaction, which was manifested in decreased values of LVP, contractile activity, CF and myocardial work. Maximum inotropic stimulation of the heart in control animals was observed in response to the addition of 7.5 mmol/l CaCl_2 , whereas in the experimental - at 5 mmol/l CaCl_2 . This indicates a decrease in myocardial functional reserves in animals under conditions of inhibition of the synthesis of hydrogen sulfide.

It was also found that under conditions of inhibition of hydrogen sulfide synthesis, oxidative stress indicators, such as superoxide and hydroxyl radicals increased as lipid peroxidation and activity of iNOS, against the decreased functional activity of cNOS in rat heart mitochondria. It was first discovered that exogenous hydrogen sulfide (10^{-6} - 10^{-7} mol/l) increases Ca^{2+} uptake into the mitochondria of adult and old rat heart under calcium loading, with 10^{-5} mol/l NaHS preventing mitochondrial pore opening in organelles. This demonstrates the regulation of Ca^{2+} transport in mitochondria by hydrogen sulfide and is the important fundamental discovery. At the same time, inhibition of endogenous H_2S formation *in vivo* reduces the threshold of sensitivity of the mitochondrial pore to Ca^{2+} and increases the swelling amplitude of adult and old rat heart mitochondria. It was shown for the first time that inhibition of the mitochondrial *in vivo* reduced the functional ability of the mitochondrial electron transport chain, which was manifested in the decrease of oxygen consumption rate in the states V_2 , V_3 and V_4 , as well as indicators of respiratory control and ADP/O. Therefore, endogenous hydrogen sulfide regulates calcium transport in mitochondria, performs an antioxidant role and supports the work of the electron transport chain in mitochondria of the heart of rats of all ages.

Key words: hydrogen sulfide, Ca^{2+} , calcium homeostasis, mitochondrial pore, respiratory chain, mitochondria, heart, rats, aging.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ	аденозинтрифосфорна кислота
АФА	активні форми азоту
АФК	активні форми кисню
ДК	дієнові кон'югати
ЕТЛ	електронно транспортний ланцюг
ІСФ	інтенсивність скоротливої функції
КП	коронарний потік
МДА	малоновий диальдегід
МП	мітохондріальна пора
О-СМН	О-карбоксиметилгідроксиламін
ПОЛ	перексине окиснення ліпідів
3-MPST	3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза
H ₂ S	сірководень
NO	оксид азоту
cNOS	конститутивна NO синтаза
eNOS	ендотеліальна NO синтаза
iNOS	індуцибельна NO синтаза
·O ₂ ⁻	супероксидний радикал
·OH	гідроксильний радикал
Рлшл	тиск у лівому шлуночку