

О.М. Семенихіна, Н.А. Струтинська, А.Ю. Будько, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

Вплив донора сірководню NaHS на функціональний стан дихального ланцюга мітохондрій серця щурів

У досліджах на мітохондріях, ізольованих із тканин серця дорослих щурів, досліджували вплив донора сірководню NaHS на стан дихального ланцюга. Виявлено, що у концентраціях 10^{-9} – 10^{-6} моль/л він спричиняв дозозалежне зменшення швидкості споживання кисню за наявності сукцината натрію та АДФ (стан 3 за Чансом), а також за умов відсутності останнього (стан 4). Водночас зменшення швидкості споживання кисню за концентрації NaHS 10^{-9} та 10^{-8} моль/л супроводжувалося підвищенням спряженості процесів окиснення та фосфорилування, про що свідчить збільшення дихального контролю; ефективність окисного фосфорилування (АДФ/О) при цьому не змінювалась. Отримані результати говорять про захисний вплив донора сірководню на функціональний стан мітохондрій. Для з'ясування інших механізмів протекторної дії H_2S також досліджували дію його донора на набухання мітохондрій. Встановлена концентраційна залежність між впливом NaHS (10^{-12} – 10^{-4} моль/л) і рівнем набухання мітохондрій серця щурів. Показано, що вони помірно набухали за умов дії донора сірководню у межах концентрацій 10^{-12} – 10^{-8} моль/л при концентрації Ca^{2+} 1 нмоль/мг білка. При дії NaHS у концентрації 10^{-9} моль/л спостерігали набухання мітохондрій, максимальна зміна рівня якого становила 11 %. Блокатор мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів (K_{ATP} -каналів) 5-гідроксидеканоат (10^{-4} моль/л) частково зменшував набухання мітохондрій за наявності NaHS (10^{-9} моль/л), що може свідчити про активацію донором H_2S K_{ATP} -каналів. Зроблено висновок щодо можливого залучення K_{ATP} -каналів до механізмів дії сірководню на мітохондріальні функції. Ключові слова: мітохондрії, сірководень, дихання, мітохондріальна пора, мітохондріальні АТФ-залежні калієві канали.

ВСТУП

Сірководень (H_2S) – біологічно активний газовий трансмітер, що ендогенно синтезується в організмі людини та тварин і бере участь у регуляції функцій різних органів і систем. Його дослідження, як важливої сигнальної молекули, почалося близько 15 років тому, і нині його відносять до родини газових медіаторів, яка також включає оксид азоту (NO) та монооксид вуглецю (CO). Відомо, що сірководень здатний вільно проникати через плазматичні мембрани клітин і брати участь у великій кількості процесів, серед яких інгібування аденілатциклази [17], транспорт цистеїну, відновлення глутатіону (GSH) і – SH-груп білків, реакції з активними формами кисню та азоту (O_2^- , H_2O_2 ,

ONOO $^-$, NO) [25], регуляція індубельної NO-синтази [6], зниження внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} , активація K_{ATP} -каналів тощо [13]. У біологічних рідинах тільки 15 % сірководню знаходиться у газоподібному стані, тоді як у вигляді гідросульфід-іона (HS^-) – близько 85 %, а сульфід-іон (S^{2-}) існує лише в залишковій кількості [22].

Внутрішньоклітинний синтез сірководню забезпечується трьома піридоксаль-5-фосфатзалежними ферментами: цистатіонін- β -синтазою (CBS), цистатіонін- γ -ліазою (CSE) та 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою у головному мозку, серцево-судинній системі, печінці, нирках та інших органах [15]. У серцево-судинній системі вирішальну роль у утворенні сірководню відіграє фермент CSE [9], хоча останнім часом все більше з'явля-

© О.М. Семенихіна, Н.А. Струтинська, А.Ю. Будько, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

ється даних щодо активності 3-меркаптопірватсульфуртрансферази [8].

До основних біологічних ефектів H_2S належать регуляція судинного тонуусу [29], скоротливої активності міокарда [11], участь у довготривалому синаптичному потенціюванні, про- та антизапальних реакціях [27], регуляція секреції інсуліну [16] тощо. Показано, що H_2S притаманні також антиоксидантні та антиапоптоичні властивості [26].

Встановлено, що однією з причин серцево-судинних захворювань є мітохондріальна дисфункція. Мітохондрії – це важливі внутрішньоклітинні органели, які окрім окисного фосфорилування регулюють залежні від кальцію процеси, опосередковані дією вільних радикалів, а також загибель клітин серця при фізіологічних і патологічних станах організму [21]. Так, ушкодження мембран органел призводить до мітохондріальної дисфункції, зменшення синтезу аденозинтрифосфату (АТФ), скоротливої активності та функціональних резервів серця і, як наслідок, зниження його насосної функції. Мітохондрії займають близько 30 % об'єму кардіоміоцитів і забезпечують синтез більше ніж 90 % АТФ, що потрібний для фізіологічної діяльності серця.

Показано, що сірководень має різноманітні властивості, які забезпечують його кардіопротекторну дію. В попередніх наших дослідженнях в умовах перфузії ізольованих сердець за методом Лангендорфа було виявлено збільшення функціональних резервів міокарда під час навантаження об'ємом у тварин, яким вводили NaHS у концентрації 10^{-4} моль/кг. Також було показано протекторний його вплив на розвиток постішемично-реперфузійних пошкоджень функції серця, а саме ступінь відновлення показників кардіодинаміки та скоротливої функції міокарда були значно вищими порівнянно з контролем [5]. Отримані дані щодо протекторного впливу сірководню корелюють з такими, які продемонстровано на різних моделях оксидативного стресу, а також ішемично-реперфузійних

пошкодженнях печінки та нирок [14].

Наслідки ішемично-реперфузійних пошкоджень насамперед проявляються у зміні проникності мітохондріальних мембран клітин міокарда, що пов'язано з формуванням неселективної кальційзалежної циклоспоринчутливої мітохондріальної пори (МП), виникнення якої призводить до індукції апоптозу [21]. Грунтуючись на отриманих нами даних щодо кардіопротекторного впливу сірководню на серце під час ішемично-реперфузійних пошкоджень [5], ми досліджували вплив різних його концентрацій на кальційіндуковане відкривання МП. Раніше нами було встановлено протекторний вплив NaHS у концентраціях, близьких до фізіологічних. У експериментах *in vivo* при одноразовому введенні щурам NaHS у концентрації 10^{-4} моль/кг, було показано зменшення чутливості МП до індуктора Ca^{2+} у серці [3].

Відомо також, що зменшення наслідків ішемично-реперфузійних пошкоджень залежить не тільки від стану проникності мітохондріальних мембран, а також і від рівня енергетичного метаболізму кардіоміоцитів, який насамперед залежить від стану дихального ланцюга мітохондрій.

Відомості про дію сірководню на стан дихального ланцюга є досить суперечливими. Тому метою нашої роботи було дослідити вплив різних концентрацій NaHS на показники функціонального стану дихального ланцюга мітохондрій серця щурів та на МП, а також з'ясувати можливі механізми цього впливу.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на дорослих (6 міс, 220–250 г) щурах лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. У кожній серії дослідів використано не менше ніж 10–12 тварин.

Виділення мітохондрій з тканин серця здійснювали методом диференційного уль-

трацентрифугування [1]. Серця ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (2–4°C), подрібнювали та гомогенізували у 9-кратному об'ємі середовища (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НCl – 25, ЕДТА – 1; рН 7,2–7,4. Гомогенат центрифугували при 700 g 8 хв (4°C), а супернатант повторно при 11000 g 16 хв (4°C). Отриманий осад (мітохондріальна фракція) ресуспендували в буфері (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НCl – 25; рН 7,2–7,4, і одразу використовували в дослідах. Концентрацію білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [18].

Відкривання МП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів. Для цього нативні мітохондрії вміщували в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120; K_2HPO_4 – 3; тріс-НCl – 25; сукцинат Na – 5; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження їх оптичної густини при $\lambda=520$ нм протягом 15 хв при концентрації Ca^{2+} 1 нмоль/мг білка. Концентрація білка в інкубаційному середовищі становила 0,4 мг/мл. Зміну рівня набухання органел визначали як різницю (Δ) у відсотках між показником набухання мітохондрій на 15-й хвилині відносно вихідного значення. Преінкубацію мітохондрій з 5-гідроксидеканоатом (10^{-4} моль/л) і циклоспорином А (10^{-5} моль/л) здійснювали протягом 5 хв до внесення в інкубаційне середовище NaHS. Зміну світлопоглинання за 15 хв у контролі приймали за 100 %.

Мітохондріальне дихання досліджували полярографічним методом з використанням закритого електрода Кларка за допомогою приладу “Oxygraph” («Hansatech instruments», Великобританія). Показники функціонального стану мітохондрій визначали за методом Чанса та Вільямса [10]. Середовище інкубації містило (ммоль/л): KCl – 120; K_2HPO_4 – 3; тріс-НCl – 25; рН 7,2. Як субстрат окиснення використовували сукцинат натрію (5 ммоль/л). Дихання стимулювали додаванням до суспензії мітохондрій 200 мкмоль/л АДФ.

За одержаними полярограмами розраховували: швидкість АДФ – стимульованого дихання (метаболічний стан 3 за Чансом, V_3) та контрольованого (метаболічний стан 4, V_4 , за відсутності АТФ) дихання мітохондрій за Чансом, дихальний контроль (V_3/V_4), коефіцієнт ефективності окисного фосфорилування.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel 2003 та Origin 6.0. Достовірність показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Однією з головних характеристик функціонування мітохондрій є робота дихального ланцюга, яку можна оцінити через спряження окиснення субстрату та фосфорилування АДФ з утворенням АТФ. Дихальний ланцюг являє собою мультикомпонентну структуру з п'яти комплексів, що локалізовані у внутрішній мембрані мітохондрій: НАДН-СоQ-оксидоредуктаза (комплекс I), сукцинат-СоQ-оксидоредуктаза (комплекс II), СоQ-цитохром c-оксидоредуктаза (комплекс III), цитохром c-оксидаза (комплекс IV) і АТФ-синтаза. Безпосередній синтез АТФ здійснює АТФ-синтаза, що локалізована у внутрішній мембрані мітохондрій біля електронно-транспортного ланцюга.

На першому етапі нашої роботи ми досліджували вплив NaHS у межах концентрацій 10^{-4} – 10^{-9} моль/л. Було показано дозозалежне зниження швидкості споживання кисню за наявності сукцинату Na як субстрату окиснення та АДФ (функціональний стан 3 за Чансом) порівняно з контролем при дії донора сірководню у концентраціях 10^{-8} , 10^{-7} та 10^{-6} моль/л, на 17, 47 і 71 % відповідно (рис. 1,а). Швидкість поглинання кисню мітохондріями у стані 4, у вищезгаданих концентраціях, за умов відсутності АДФ також зменшувалася на 26, 68 і 81 % відповідно (див. рис. 1,б). Вплив донора сірководню у концентрації 10^{-9} моль/л спричиняв незначне

зменшення швидкості поглинання кисню в функціональних станах 3 і 4 порівняно з контролем. Для додаткового аналізу впливу NaHS використовували роз'єднувач окисного фосфорилування 2,4-динітрофенол. За умов використання останнього при дії NaHS у концентраціях 10^{-8} – 10^{-9} моль/л показано достовірне збільшення швидкості поглинання кисню на 52 і 43 % відповідно.

Вищі концентрації донора сірководню в межах 10^{-7} – 10^{-4} моль/л за умов введення 2,4-динітрофенолу не призводили до збільшення швидкості поглинання кисню, що свідчить про повне інгібування функціонування дихального ланцюга за цих концентрацій.

Зменшення швидкості поглинання кисню за концентрації NaHS 10^{-8} моль/л супроводжувалося збільшенням спряженості процесів окиснення і фосфорилування, про що говорить достовірне підвищення показників

дихального контролю на 21 % порівняно з контролем (рис. 2). При концентрації NaHS 10^{-9} моль/л спостерігали тенденцію до збільшення дихального контролю.

Невелике підвищення дихального контролю, при зниженні швидкості V_3 , говорить про збільшення ефективності роботи дихального ланцюга на тлі зниження електронно-транспортної функції, що може свідчити про економізацію процесів енергоутворення у міокарді. Також слід відмітити, що ефективність синтезу АТФ, на що вказує значення коефіцієнта АДФ/О, не змінювалося за цих концентрацій (рис. 3).

Отже, результати наших досліджень показують протекторний вплив донора сірководню на функціональний стан дихального ланцюга й окисного фосфорилування мітохондрій. Зниження швидкості споживання кисню у функціональних станах 3 і 4 внаслідок депо-

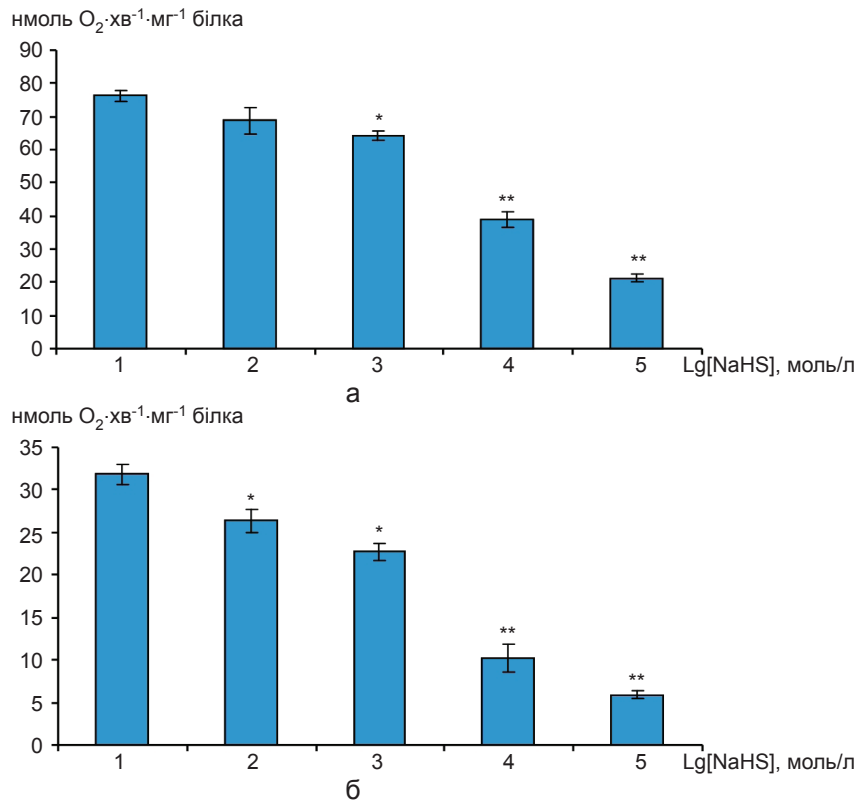


Рис. 1. Швидкість споживання кисню мітохондріями серця у стані 3 (а) та 4 (б) за Чансом за дії різних концентрацій донора сірководню NaHS: 1 – контроль, 2, 3, 4, 5 – дія NaHS (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} моль/л відповідно). *P<0,05, **P<0,01 відносно контролю

ляризації та блокування транспорту електронів, відсутність впливу на дихальний контроль, і навіть невелике його збільшення сприяють зменшенню утворення активних форм кисню, що спричинюють кардіопротекцію.

Як раніше повідомлялося, зменшення ішемічно-реперфузійних пошкоджень залежить не тільки від енергетичного метаболізму кардіоміоцитів, який зумовлений станом дихального ланцюга мітохондрій, а й від ступеня проникності мітохондріальних мембран. Участь газових медіаторів у сигнальних механізмах, що пов'язані з регуляцією відкриття МП, є актуальним питанням, оскільки зменшення чутливості її до індукторів, лежить в основі кардіопротекторних механізмів.

Тому на наступному етапі нашої роботи ми досліджували набухання ізольованих мітохондрій серця шурів в умовах дії NaHS у межах концентрацій 10^{-12} – 10^{-4} моль/л при 1 нмоль/мг білка Ca^{2+} . Було показано, що донор сірководню за концентрацій 10^{-12} – 10^{-8} моль/л спричиняв помірне набухання мітохондрій серця. При дії NaHS у концентрації 10^{-10} моль/л спостерігали набухання мітохондрій, максимальна зміна його рівня становила 11 % (рис. 4).

Відомо, що однією з основних молекулярних мішеней дії сірководню є активація

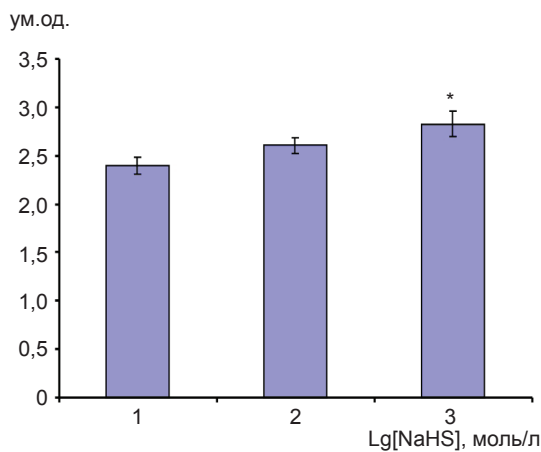


Рис. 2. Дихальний контроль за Чансом (V_3/V_4) в мітохондріях серця шурів при дії різних концентрацій донора сірководню NaHS: 1 – контроль, 2, 3 – дія NaHS (10^{-9} , 10^{-8} моль/л відповідно). * $P < 0,05$ відносно контролю

K_{ATP} -каналів [13]. Так, показано, що H_2S -індуковане розслаблення судин опосередковується в основному через відкриття останніх у гладеньких м'язів судин [29]. Ці канали знаходяться на поверхні клітинних мембран і у внутрішній мембрані мітохондрій багатьох різних типів клітин, в тому числі підшлункових β -клітин, нейронів, кардіоміоцитів, клітин печінки та скелетних і гладеньких м'язових клітин [7]. Також існує багато даних стосовно того, що активація K_{ATP} -каналів сприяє захисту міокарда під час ішемії–реперфузії. Однак досі залишається не зрозумілим, які саме – сарколемальні чи мітохондріальні K_{ATP} -канали відіграють провідну роль у кардіопротекції, що спричиняється дією донора сірководню.

Відомо, що активація мітохондріальних K_{ATP} -каналів спричиняє надходження K^+ до матриксу мітохондрій, що може спричинити незначне їх набухання і тим самим відігравати суттєву роль у кардіопротекції, оскільки це сприяє збереженню контактних сайтів між внутрішньою та зовнішньою мембранами, а також оптимальній орієнтації для входу АДФ у матрикс мітохондрій. Це має особливе значення при ішемії, яка призводить до порушення зв'язків між цими компонентами, і до зниження енергозабезпечення клітини. Також одним з основних механізмів кардіопротекції, яка пов'язана з активацією мітохондріальних

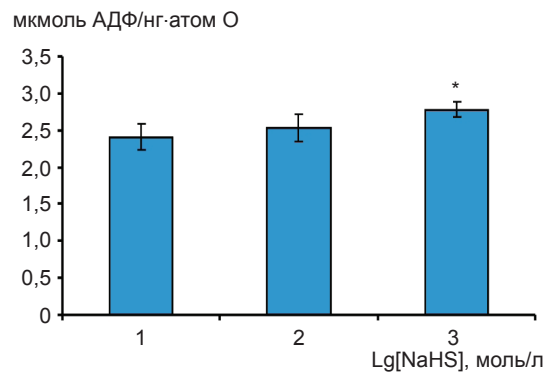


Рис. 3. Коефіцієнт ефективності фосфорилування у мітохондріях серця шурів при дії різних концентрацій донора сірководню NaHS: 1 – контроль, 2, 3 – дія NaHS (10^{-9} , 10^{-8} моль/л відповідно). * $P < 0,05$ відносно контролю

K_{ATP} -каналів, є зменшення перевантаження матриксу мітохондрій кальцієм.

Ми припустили участь мітохондріальних K_{ATP} -каналів у H_2S -індукованому набуханні мітохондрій. Для цього використали специфічний їх блокатор 5-гідроксидеканоат (10^{-4} моль/л). Було показано, що він частково зменшує набухання мітохондрій серця щурів (рис. 5). Але молекулярні механізми, що лежать в основі впливу сірководню на K_{ATP} -канали, все ще залишаються нез'ясованими. Відомо, що один з основних механізмів дії сірководню – модифікація білків. Це відбувається за рахунок відновлення дисульфідних зв'язків ($S=S$) або при приєднанні атома сірки до тіолової групи, – SH , в результаті чого вона перетворюється на гідроперсульфідний залишок, – SSH . Обидві модифікації призводять до зміни конформації та функціональної активності білка. Також є дані про можливий вплив H_2S через активування протеїнкінази C [27].

Крім того, нами проведена серія експериментів з використанням інгібітора МП циклоспорину А. Було показано, що сумісна дія 5-гідроксидеканоату та останнього спри-

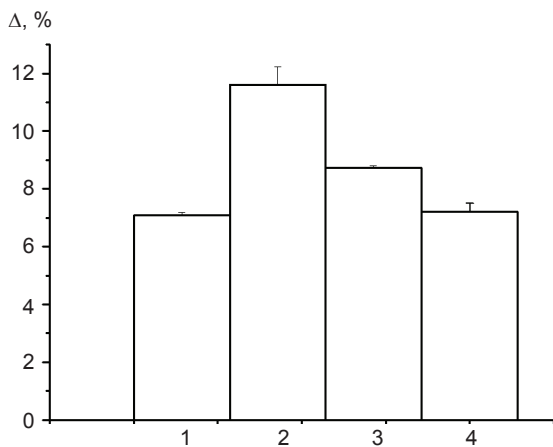


Рис. 4. Вплив інгібітора мітохондріальних K_{ATP} -каналів 5-гідроксидеканоату та інгібітора мітохондріальної пори циклоспорину А на набухання мітохондрій серця щурів: 1 – контроль; 2 – дія NaHS (10^{-9} моль/л); 3 – преінкубація з 5-гідроксидеканоатом (10^{-4} моль/л), дія NaHS; 4 – преінкубація з 5-гідроксидеканоатом і циклоспорином А (10^{-5} моль/л), дія NaHS. * $P < 0,05$ відносно контролю

чиняла зменшення набухання мітохондрій до контрольних значень. У попередніх дослідженнях доведено, що як 5-гідроксидеканоат, так і циклоспорин А не впливали на цей показник.

МП є мультибілковим комплексом, що пронизує подвійну мембрану мітохондрій і може утворюватись як за фізіологічних, так і патологічних умов. За допомогою методу patch-clamp показано, що *in vitro* та *in situ* МП “пульсує”, і це дало змогу припустити, що в інтактних органелах існує низькопровідна “мерехтлива” пора, яка необхідна для підтримання внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу [12]. За фізіологічних умов МП існує у стані низької провідності (low-conductance state), що створює у цитоплазмі клітин підвищення концентрації кальцію, близьке до механізму кальційіндукованого вивільнення цього іона, що вперше було виявлено в ендоплазматичному ретикулумі [12].

Отже, можна зробити висновок, що донор сірководню у межах концентрацій 10^{-12} – 10^{-8} моль/л проявляв подвійні ефекти, які пов'язані з активуванням мітохондріальних K_{ATP} -каналів, а також безпосереднім впливом на МП, спричиняючи її функціонування у режимі низької провідності що в ці-

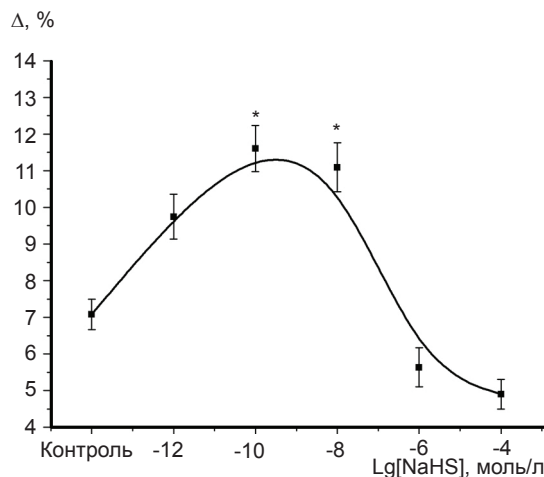


Рис. 5. Концентраційна залежність впливу донора сірководню NaHS на набухання мітохондрій серця при концентрації кальцію 1 нмоль/мг білка. Δ, % – різниця між показником набухання мітохондрій на 15 хв відносно вихідного значення. * $P < 0,05$ відносно контролю

лому сприяє вивільненню кальцію з матриксу мітохондрій.

У початкові періоди ішемії клітина прагне знизити вхід кальцію, що лавиноподібно підвищується за впливу катехоламінів, та знизити чутливість м'язового скоротливого апарату до них. Відомий ефект зниження кальцієвого навантаження – робота неселективних мітохондріальних пор. Але надлишок кальцію не може бути повністю відкачаним з мітохондрій через нестачу АТФ, яка в свою чергу утворюється в обмеженій кількості внаслідок роз'єднання процесів дихання і окисного фосфорилування, що створює надлишок цих катіонів. Саме механізми економного використання кисню, індуковані дією сірководню, є одним із шляхів зниження негативних наслідків ішемії. Крім того, важливу роль за цих умов відіграє зв'язування сірководнем вільнорадикальних форм, що також зменшує негативні наслідки стресового ушкодження мембран, зокрема кардіоміоцитів.

ВИСНОВКИ

1. Показано дозозалежне зниження швидкостей поглинання кисню за наявності сукцинату Na та АДФ (стан 3 за Чансом), а також за відсутності останнього (стан 4), при дії NaHS у межах концентрацій 10^{-9} – 10^{-6} моль/л.

2. Зменшення швидкості споживання кисню мітохондріями супроводжувалося збільшенням спряженості процесів окиснення та фосфорилування, про що свідчить збільшення дихального контролю. Ефективність окисного фосфорилування (АДФ/О) достовірно підвищувалася.

3. Виявлено достовірне збільшення швидкості роз'єданого дихання за використання 2,4-динітрофенолу при дії NaHS у концентраціях 10^{-8} – 10^{-9} моль/л. Більш високі його концентрації (10^{-7} – 10^{-6} моль/л) за введення цього роз'єднувача не спричиняли збільшення швидкості поглинання кисню, що свідчить про повне інгібування дихального ланцюга.

4. Донор сірководню у межах концен-

трацій 10^{-12} – 10^{-8} моль/л викликав помірне набухання мітохондрій серця.

5. Преінкубація ізольованих мітохондрій з блокатором мітохондріальних $K_{\text{АТФ}}$ -каналів 5-гідроксидеканоатом (10^{-4} моль/л) частково зменшувала рівень набухання органів серця щурів, що спричинялося дією донора сірководню у концентрації 10^{-9} моль/л. Це свідчить про можливу активацію цих каналів.

6. Сумісна дія 5-гідроксидеканоату та інгібітора МП циклоспорину А зменшувала набухання мітохондрій до контрольних значень.

**Е.Н. Семенихіна, Н.А. Струтинская,
А.Ю. Будько, Г.Л. Вавилова, В.Ф. Сагач**

ВЛИЯНИЕ ДОНОРА СЕРОВОДОРОДА NaHS НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА КРЫС

В опытах на митохондриях, изолированных из тканей сердца взрослых крыс, исследовали влияние донора сероводорода – NaHS на состояние дыхательной цепи. Выявлено, что донор сероводорода в концентрациях 10^{-9} – 10^{-6} моль/л, вызывал дозозависимое уменьшение скорости потребления кислорода при наличии сукцината натрия и АДФ (состояние 3 по Чансу), а также при отсутствии последнего (состояние 4). При этом уменьшение скорости потребления кислорода при концентрации NaHS 10^{-9} моль/л и 10^{-8} моль/л сопровождалось повышением сопряженности процессов окисления и фосфорилирования, о чем свидетельствует увеличение показателя дыхательного контроля; эффективность окислительного фосфорилирования (АДФ/О) при этом не менялась. Полученные результаты свидетельствуют о защитном влиянии донора сероводорода на функциональное состояние митохондрий. Для выяснения других механизмов протекторного действия H_2S также исследовали влияние донора сероводорода на набухание митохондрий. Установлена концентрационная зависимость между влиянием NaHS (10^{-12} – 10^{-4} моль/л) и уровнем набухания митохондрий сердца крыс. Показано, что при концентрации Ca^{2+} 1 нмоль/мг белка в инкубационной среде, в условиях действия донора сероводорода в пределах концентраций 10^{-12} – 10^{-8} моль/л, происходило умеренное набухание митохондрий сердца крыс. При действии NaHS в концентрации 10^{-9} моль/л наблюдали набухание митохондрий, максимальное изменение уровня которого составляло 11 %. Блокатор митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов ($K_{\text{АТФ}}$ -каналов) 5-гидроксидеканоат (10^{-4} моль/л) частично уменьшал набухание митохондрий при наличии NaHS (10^{-9} моль/л), что может свидетельствовать об активации донором сероводорода $K_{\text{АТФ}}$ -каналов. Сделан вывод относительно

возможного участія мітохондріальних K_{ATP} -каналів в механізмах реалізації сероводорода.

Ключевые слова: мітохондрії, сероводород, дихання, мітохондріальна пора, мітохондріальні АТФ-зависимые калієві канали.

O.M. Semenykhina, N.A. Strutynska, A.Yu. Budko, G.L. Vavilova, V.F. Sagach

EFFECT OF HYDROGEN SULFIDE DONOR NaHS ON THE FUNCTIONAL STATE OF THE RESPIRATORY CHAIN OF RAT HEART MITOCHONDRIA

In experiments on mitochondria isolated from the heart tissue of adult rats we studied the effects of a donor of hydrogen sulfide, NaHS, on the respiratory chain of the organelles. We found that NaHS (10^{-9} - 10^{-6} mol/l) caused a dose-dependent decrease in the rate of oxygen consumption in the presence of succinate and ADP (state 3 to Chance), and in the absence of ADP (state 4). The decrease in the rate of oxygen consumption in a concentration NaHS 10^{-9} mol/l and 10^{-8} mol/l associated with an increased conjugation of oxidation and phosphorylation, as evidenced by the increase in the respiratory control, the efficiency of oxidative phosphorylation (ADP/O) is not changed. Our studies suggest a protective effect of hydrogen sulfide donor on the functional state of the mitochondria. To elucidate of other the mechanisms of the protective action H_2S we also investigated the effect of hydrogen sulfide donor on the mitochondrial swelling. It was found that NaHS in the range of concentration 10^{-12} – 10^{-4} mol/l influences the level of mitochondria swelling of the rats heart in the dose-dependent manner. It was also shown that when the concentration of Ca^{2+} 1 nmol/mg protein in the medium, under the action of hydrogen sulfide in the donor concentration range 10^{-12} - 10^{-8} mol/l, there was a moderate swelling of rats heart mitochondria. Under the action of NaHS at a concentration of 10^{-9} mol/l it was observed swelling of the mitochondria, the maximum change in the level of which was 11%. Inhibitor of mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP} channels) 5-hydroxydecanoate (10^{-4} mol/l) partially reduced the mitochondrial swelling in the presence of NaHS (10^{-9} mol/l), which may indicate the activation of K_{ATP} channels. Our studies point for possible involvement of mitochondrial K_{ATP} channels in implementation of the mechanisms of H_2S .

Key words: mitochondrial permeability transition pore (MPTP), hydrogen sulfide, respiration.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого

контроля расслабления миомерия // Биохимия. – 1985. – 50, №8. – С.1350–1361.

2. Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка, 2008.
3. Струтинська Н.А., Семенихіна О.М., Чорна С.В., Вавилова Г.Л., Сагач В.Ф. Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкриття мітохондріальної пори у серці дорослих і старих шурів // Фізіол. журн. – 2011. – 57, №6. – С.3–15.
4. Ткаченко Г.М., Кургалюк Н.М., Вовкович Л.С. Вплив активатора K_{ATP} -каналів – пінацидиту на функціонування мітохондрій печінки шурів із різною резистентністю до гіпоксії за стресу // Укр. біохім. журн. – 2004. – 76, №1. – С.56–64.
5. Шиманська Т.В., Гошовська Ю.В., Семенихіна О.М., Сагач В.Ф. Вплив сірководню на реакції ізольованого серця шурів при навантаженні об'ємом і ішемії–реперфузії // Фізіол. журн. – 2012. – 58, №6. – С.57–66.
6. Ali M.Y., Ping C.Y., Mok Y.Y., Ling L., Whiteman M., Bhatia M., Moore P.K. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? // Brit. J. Pharmacol. – 2006. – №149. – P. 625–634.
7. Baukowitz T. Fakler B. KATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids // Eur. J Biochem. – 2000. – №267. – P. 5842–5848.
8. Billaut-Laden I., Rat E., Allorge D., Crunelle-Thibaut A., Cauffiez C., Chevalier D., Lo-Guidice J.M., Broly F. Evidence for a functional genetic polymorphism of the human mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST), a cyanide detoxification enzyme // Toxicol. Lett. – 2006. – №165. –P.101–111.
9. Bian J.S., Yong Q.C., Pan T.T., Feng Z.N., Ali M.Y., Zhou S., Moore P.K. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes // J. Pharmacol Exp. Therap. – 2006. – №316.– P. 670–678.
10. Chance B., Williams G. The respiratory chain and oxydative phosphorylation // Adv.Enzymol. – 1956. –17. – P. 65–134.
11. Elrod J.W., Calvert J.W., Morrison J., Doeller J.E., Kraus D.W., Tao L., Jiao X., Scalia R., Kiss L., Szabo C., Kimura H., Chow C.W., Lefter D.J. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function // Proc. Natl. Acad. Sci USA – 2007. – №104. – P. 15560–15565.
12. Ichas F., Jonaville L.S., Mazat J.P Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals // Cell. – 1997. – №89. – P.1145–1153.
13. Johansen D., Ytrehus K., Baxter G.F. Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury—evidence for a role of K ATP channels // Basic. Res. Cardiol. – 2006. – №101. – P. 53–60.
14. Jha S., Calvert J.W. Duranski MR. Ramachandran A. Lefter DJ. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-

- reperfusion injury: Role of antioxidant and antiapoptotic signaling // Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol. – 2008. – №295. – P. 801–806.
15. Kabil O., Banerjee R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide // J. Biol. Chem. – 2010. – №285. – P. 21903–21907.
 16. Li L., Bhatia M., Moore P.K. Hydrogen sulphide—a novel mediator of inflammation? // Curr. Opin. Pharmacol. – 2006. – №6. – P. 125–129.
 17. Lim J.J., Liu Y.H., Khin E.S., Bian J.S. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells // Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2008. – №29. – P. 1261–1270.
 18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – №1. – P.265–275.
 19. Ming Fua, Weihua Zhangb, Lingyun Wub, Guangdong Yangd, Hongzhu Lia, Rui Wanga. Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production // PNAS. – 2012. – № 8. – P. 2943–2947.
 20. Pan T.T., Neo K.L., Hu L.F., Yong Q.C., Bian J.S. H₂S preconditioning- induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. – 2008. – №294. – P. 169–177.
 21. Rasola A., Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis // Cell Calcium. – 2011. – №50. – P.222–233.
 22. Reiffenstein R.J., Hulbert W.C., Roth S.H. Toxicology of hydrogen sulfide // Pharmacol. and Toxicol. – 1992. – №32. – P.109–134.
 23. Shibuya N., Mikami Y., Kimura Y., Nagahara N., Kimura H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide // J. Biochem. – 2009. – №146. – P. 623–626.
 24. Shibuya N., Tanaka M., Yoshida M., Ogasawara Y., Togawa T., Ishii K., Kimura H. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain // Antioxid. Redox. Signal. – 2009. – №11. – P. 703–714.
 25. Sojitra B., Bulani Y., Putcha U.K., Kanwal A., Gupta P., Kuncha M., Banerjee S.K. Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide-induced cardioprotection in mice // Mol. Cell Biochem. – 2012. – №360. – P. 61–69.
 26. Sodha N.R., Clements R.T., Feng J., Liu Y., Bianchi C., Horvath E.M., Szabo C., Sellke F.W. The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to injury. ischemiareperfusion // Eur. J. Cardiothorac. Surg – 2008. – №33. – P. 906–913.
 27. Wang R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide // Antioxid. Redox. Signal. – 2003. – №5. – P. 493–501.
 28. Zhao X., Zhang L.K., Zhang C.Y., Zeng X.J., Yan H., Jin Tang C.S., Du JB. Regulatory effect of hydrogen sulfide on vascular collagen content in spontaneously hypertensive rats // Hypertens Res. – 2008. – №31. – P. 1619–1630.
 29. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener // EMBO J. – 2001. – №20. – P. 6008–6016.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: veritatessplendor@i.ua

Матеріал надійшов
до редакції 24.12.2012