

# Активация синтеза эндогенного серководню пригнічує відкривання мітохондріальної пори та відновлює спряження конститутивної NO-синтази у серці старих щурів

Л.А. Мись, Н.А. Струтинська, В.Р. Струтинський, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: myslida@ukr.net

*Вивчали вплив кофактора  $H_2S$ -синтезувальних ферментів – піридоксаль-5-фосфату (П5Ф) на чутливість мітохондріальної пори (МП) до дії природного її індуктора  $Ca^{2+}$  у серці старих щурів, а також на вміст  $H_2S$  та показники оксидативно-нітрозативного стресу в мітохондріях серця. Показано, що у старих тварин розвивається оксидативний і нітрозативний стрес, що супроводжується зниженням індексу спряження конститутивної  $Ca^{2+}$ -залежної NO-синтази (cNOS). Застосування П5Ф пригнічувало  $Ca^{2+}$ -індуковане відкривання МП через зменшення чутливості до її індуктора у серці старих щурів. Використання модулятора синтезу  $H_2S$  призводило до зростання вмісту серководню у 4,2 раза, а також сприяло зниженню швидкості генерації  $\cdot O_2^-$  у 3,5 раза порівняно з цими показниками у старих тварин. Важливим наслідком стимуляції ендогенного синтезу серководню при старінні є підвищення активності cNOS у мітохондріях серця у 1,9 раза та зниження у 4,3 раза активності  $Ca^{2+}$ -незалежної індукцйбельної NO-синтази (iNOS). За цих умов в органелах індекс спряження cNOS зростав у 8,7 раза відносно значень у старих тварин. Таким чином,  $H_2S$  виступає як регулятор відкривання МП, а також синтезу NO, збільшуючи активність cNOS та відновлюючи спряжений стан ферменту, що свідчить про важливу роль цього газового трансмітера в патології серцево-судинної системи.*

*Ключові слова: серководень; спряження cNOS; оксидативно-нітрозативний стрес; старіння; мітохондрії; серце; щури.*

## ВСТУП

Серководень ( $H_2S$ ) – третій газоподібний медіатор, який ідентифікований у ссавців разом з оксидом азоту (NO) і монооксидом вуглецю (CO). Як сигнальна молекула він виконує численні важливі для життєдіяльності функції з різними біохімічними і фізіологічними ефектами [1, 2]. Показано, що за фізіологічних концентрацій ця молекула ендогенно синтезується в організмі у процесі метаболізму серковмісної амінокислоти L-цистеїну піридоксаль-5-фосфатзалежними ферментами, а саме цистатіонін-γ-ліазою і цистатіонін-β-синтазою, що знаходяться в цитоплазмі клітин, а також мітохондріальною

3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою, кон'югованою з цистеїнамінотрансферазою [3, 4]. Нині відомо, що  $H_2S$  як фізіологічний медіатор бере участь у таких процесах, як регуляція судинного тонуусу, ангіогенез, нейромодуляція тощо. Останнім часом з'являється все більше даних про те, що серководень має кардіопротекторні властивості, які зумовлені, зокрема, його здатністю пригнічувати оксидативний стрес і розвиток апоптозу [3, 5–7].

Порушення біосинтезу серководню є істотним чинником у розвитку патологічних станів організму, тому дослідження механізмів регуляції  $H_2S$ -синтезувальних ферментів та дії донорів серководню і прекурсорів

викликають значний інтерес. Так, у разі старіння виявлено дефіцит цього ендогенно синтезованого медіатора у тканинах серця і судинах, що має негативні наслідки на функціонування серцево-судинної системи [8]. З іншого боку, його надмірний вміст також може мати патологічні ефекти, що проявляються, наприклад, пригніченням активності цитохром-*c*-оксидази дихального ланцюга мітохондрій.

Протекторні механізми дії  $H_2S$  за даними різних авторів неоднозначні і можуть бути пов'язані як з активацією АТФ-залежних  $K^+$ -каналів, відновленням конститутивного  $Ca^{2+}$ -залежного синтезу NO (cNOS), пригніченням оксидативного стресу, так і впливом на внутрішньоклітинні структури, а саме неспецифічний мегаканал – мітохондріальну пору (МП) [5, 9]. Незважаючи на явні свідчення того, що  $H_2S$  проявляє різноманітні ефекти в організмі, механізми його дії досі залишаються нез'ясованими.

Відомо, що в основі захворювань серця при старінні лежить дисфункція мітохондріальних внутрішніх механізмів, яка найчастіше викликана формуванням неселективної МП у режимі високої провідності, що супроводжується оксидативно-нітрозативним стресом, пригніченням активності cNOS та зниженням вмістом  $H_2S$  тощо [8, 10, 11].

Метою нашої роботи було оцінити вплив стимуляції ендогенно синтезованого сірководню на чутливість МП до її природного індуктора  $Ca^{2+}$ , систему NO, а також показники оксидативно-нітрозативного стресу у мітохондріях серця старих тварин.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, 200–250 г) та старих (22–24 міс, 300–350 г) самцях-щурах лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію. При дослідженні враховано Міжнародні принципи Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних

цілей (Страсбург, 1986).

Для стимуляції синтезу сірководню і відновлення його пулів у тканинах ми вводили кофактор  $H_2S$ -синтезувальних ферментів – піридоксаль-5-фосфат (П5Ф). Дослідних тварин було поділено на 3 групи по 10 щурів у кожній. До 1-ї та 2-ї контрольних груп ввійшли дорослі та старі тварини відповідно, яким вводили дистильовану воду (*per os*), а щурам 3-ї групи – П5Ф (*per os*) з розрахунку 0,7 мг/кг [7] впродовж 14 діб.

Відкривання МП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів [5]. Для цього мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс-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 5 хв до і впродовж 15 хв їх набухання за наявності індуктора  $Ca^{2+}$  у межах концентрацій  $10^{-7}$ – $10^{-4}$  моль/л. Амплітуду набухання органел визначали як різницю між значеннями оптичної щільності суспензії мітохондрій на 15-й та 1-й хвилині ( $\Delta D_{520} \cdot 10^2$ ). Концентрація білка, яку визначали за методом Лоурі, в інкубаційному середовищі становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій без індуктора з наступною реєстрацією оптичної густини протягом 15 хв.

У мітохондріях серця визначали біохімічні показники оксидативного стресу: швидкість генерації супероксидного ( $\cdot O_2^-$ ) і гідроксильного ( $\cdot OH$ ) радикалів, пули стабільного пероксиду водню ( $H_2O_2$ ), ейкозаноїдів – тромбоксану  $B_2$  ( $TxB_2$ ) та пептидолейкотрієну  $C_4$  ( $LTC_4$ ), сечової кислоти, дієнових кон'югатів (ДК) та малонового діальдегіду (МДА) за методами застосованими нами раніше [12]. Оцінювали стан системи оксиду азоту: активність cNOS та кальційне-залежної індуктибельної NO-синтази (iNOS), активність нітратредуктази, аргінази та пули стабільних метаболітів NO – нітрит ( $NO_2^-$ ) і нітрат ( $NO_3^-$ ) аніонів, низькомолекулярних

нітрозотіолів (НМНТ) та вміст ендogenous  $\text{H}_2\text{S}$  [13]. Індекс спряження cNOS розраховували як відношення активності cNOS до швидкості генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  без та за наявності її інгібітора L-NAME [7].

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), Student (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що вміст  $\text{H}_2\text{S}$  у мітохондріях серця старих щурів становив  $2,38 \pm 0,45$  нмоль/мг, що у 1,9 раза нижче, ніж у дорослих ( $4,58 \pm 0,3$  нмоль/мг,  $P \leq 0,05$ ). Застосування П5Ф призводило до зростання вмісту сірководню у 4,2 раза ( $10,13 \pm 1,6$  нмоль/мг білка у старих тварин після дії П5Ф,  $P \leq 0,05$ ) порівняно зі старими тваринами. Таким чином, ми спостерігали відновлення синтезу сірководню при старінні, ймовірно, за рахунок активації  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезуювальних ферментів кофактором П5Ф.

Показано, що зміна амплітуди набухання мітохондрій ( $\Delta D_{520} \cdot 10^2$ ) у безкальцієвому середовищі становила 6,3 та 11,3 у дорослих

та старих тварин відповідно (рис. 1,а). За умов навантаження органел кальцієм (до  $10^{-4}$  моль/л) цей показник при старінні зростає до 22,5 порівняно зі значеннями у дорослих тварин (17,3). Дані попередніх наших досліджень показали, що мітохондрії тканин серця старих щурів на відміну від таких у дорослих мають підвищену проникність мембран, у результаті чого набувають здатності до вивільнення через пору низькомолекулярних речовин з молекулярною масою більше ніж 1,5 кДа, що є показником її відкриття [14]. Як відомо, однією з ключових ланок процесів старіння організму є накопичення та тривала дія вільних радикалів, які є індукторами МП. Пошук системи захисту мітохондрій від впливу вільнорадикальних процесів займає вагомe місце у сучасних дослідженнях. Останнім часом з'являється все більше даних про кардіопротекторні властивості  $\text{H}_2\text{S}$ , які зумовлені, зокрема, його здатністю стимулювати синтез NO та пригнічувати оксидативний стрес і розвиток апоптозу. Тому для з'ясування захисного впливу кофактора  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезуювальних ферментів – П5Ф щодо відкриття МП досліджували дію  $\text{Ca}^{2+}$  у концентрації  $10^{-4}$  моль/л (див. рис.1,б). Виявили, що ви-

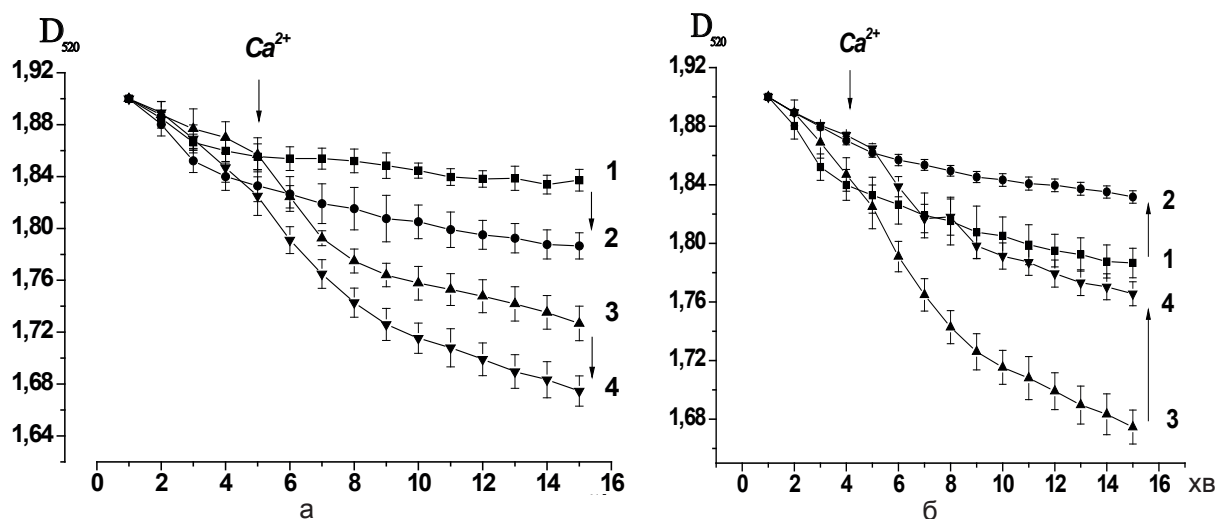


Рис. 1. Вплив піридоксаль-5-фосфату (П5Ф) на мітохондріальну пору у серці старих щурів: а – набухання мітохондрій серця дорослих (1) та старих щурів (2) у безкальцієвому середовищі та за дії  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л) (3, 4) відповідно; б – набухання мітохондрій серця старих щурів (1) та після введення П5Ф (2) у безкальцієвому середовищі та за дії  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л) (3, 4) відповідно

користання цього модулятора зменшувало амплітуду набухання мітохондрій порівняно зі старими тваринами як у безкальцієвому середовищі, так за його наявності у 1,8 та 1,7 раза відповідно.

На наступному етапі роботи ми досліджували вплив П5Ф на чутливість МП до дії природного індуктора  $\text{Ca}^{2+}$ , використовуючи його в діапазоні концентрацій  $10^{-7}$ – $10^{-4}$  моль/л (рис.2). Поріг чутливості відповідав найменшій концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , яка викликала набухання мітохондрій у серці. Як видно з рисунку, при старінні відбувається зсув концентраційної кривої вгору відносно контролю, що свідчить про зниження порога дії  $\text{Ca}^{2+}$  на набухання органел і, як наслідок, збільшення чутливості МП до дії цього іона. Показано, що використання модулятора синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  зменшувало амплітуду набухання мітохондрій за дії всіх використаних концентрацій індуктора порівняно з цим показником у старих тварин. Спостерігали зменшення чутливості МП до кальцію, внаслідок підвищення на три порядки порогової концентрації індуктора, яка спричиняла набухання органел.

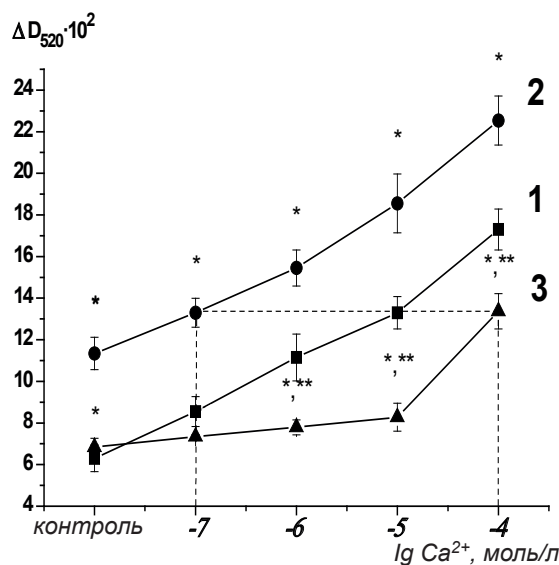


Рис. 2. Зміна чутливості мітохондріальної пори до дії індуктора кальцію у серці за умов дії піридоксаль-5-фосфату (П5Ф): 1 – дорослі щури (контроль); 2 – старі щури; 3 – дія П5Ф, \* $P \leq 0,05$  відносно значень у контролі; \*\* $P \leq 0,05$  відносно значень у старих щурів

Таким чином, застосування П5Ф пригнічувало  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане відкривання МП через зменшення чутливості до її індуктора у серці старих щурів.

Для з'ясування можливих біохімічних механізмів впливу П5Ф на зміну чутливості МП до  $\text{Ca}^{2+}$  у старих тварин, ми визначили ступінь оксидативного і нітрозативного стресу у мітохондріях серця. Встановлено, що більшість показників були вищими від контрольних значень, що свідчить про посилення у цих органелах вільнорадикальних процесів [8]. До найбільш токсичних вільних радикалів відносять  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ , синглетний кисень і пероксинітрит ( $\text{ONOO}^-$ ). Основними джерелами утворення  $\cdot\text{O}_2^-$  як ініціатора оксидативного стресу є комплекси I і III дихального ланцюга мітохондрій, НАДФН- і ксантиноксидаза, неспряжена cNOS, цикло- і ліпооксигеназа [15]. Утворений  $\cdot\text{O}_2^-$  за дії супероксиддисмутази дисоціює у  $\text{H}_2\text{O}_2$ , метаболізм якого відбувається двома шляхами: нетоксичним за участі каталази з утворенням  $\text{H}_2\text{O}$  і  $\text{O}_2$  і токсичним в реакції Фентона із утворенням  $\cdot\text{OH}$  [16]. Як відомо, останній ініціює перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), розпад яких призводить до появи різноманітних вторинних і кінцевих продуктів, а саме ДК і МДА. У разі одночасної надмірної продукції  $\cdot\text{O}_2^-$  і NO, що спостерігається, зокрема, при неспряженій cNOS та підвищеній активності iNOS, вони взаємодіють із утворенням високотоксичного  $\text{ONOO}^-$ .

Показано, що за умов активації ендогенного синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  після застосування П5Ф швидкість генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  знижувалася у 3,5 раза порівняно з таким у старих тварин (рис.3). Цей показник при старінні майже у 4 рази перевищував контрольні значення. Про обмеження оксидативного стресу за дії кофактора синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  можуть свідчити зміни вмісту стабільної активної форми кисню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) і продуктів неферментативного (ДК) та ферментативного ( $\text{LTC}_4$  і  $\text{TxB}_2$ ) окиснення ліпідів. Зокрема, вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$  після дії П5Ф був нижчим у 1,5 раза порівняно з контрольними

значеннями. Швидкість утворення найбільш активного радикала кисню –  $\cdot\text{OH}$ , який є продуктом деградації  $\text{H}_2\text{O}_2$  в реакції Фентона, після модуляції синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  знижувалася в 1,3 раза порівняно зі значеннями у старих щурів. Введення П5Ф також знижувало у 3,3 раза пули  $\text{LTC}_4$ , які характеризують активність ліпоксигеназного шляху генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  і в 2,3 раза (порівняно зі значенням у старих тварин) пули сечової кислоти, які характеризують активність ксантиноксидази і одночасно є маркером гіпоксії та деградації АТФ. Вміст  $\text{TxB}_2$ , який є маркером циклооксигеназного шляху генерації супероксиду, знижувався у 4,3 раза за дії кофактора синтезу  $\text{H}_2\text{S}$ . Зменшення продукції  $\text{LTC}_4$  і  $\text{TxB}_2$  може свідчити про пригнічення активності ферментів ліпооксигенази, циклооксигенази і, як результат, призводити до зниженого утворення супероксид-аніона.

Ще одним проявом антиоксидантної дії П5Ф може бути зменшення вмісту продуктів ПОЛ – високотоксичних сполук ДК та МДА. Ці речовини не лише негативно впливають на

мембрани, але й ініціюють мітохондіальний процес апоптозу, що призводить до пошкодження клітин внаслідок відкривання МП [12]. У мітохондріях серця при старінні ми отримали збільшення в 9,2 раза вмісту ДК та в 2,7 раза МДА щодо контролю. Введення П5Ф достовірно зменшувало у 2,7 і 3 рази пули ДК та МДА порівняно з такими при старінні, що свідчить про потужний протекторний ефект  $\text{H}_2\text{S}$  та пригнічення утворення іціаторів ПОЛ –  $\cdot\text{OH}$ - та  $\cdot\text{NO}_2^-$ -радикалів.

Одночасно з розвитком оксидативного стресу спостерігається і нітрозативний стрес (рис.4). Дані попередніх досліджень показали, що у мітохондріях серця старих тварин спостерігається значне зниження активності cNOS, зростання активностей iNOS та нітратредуктази (шлях реутилізаційного синтезу NO) і зниження пулів НМНТ (шлях декомпозиційного синтезу NO) [8]. Посилюється також неокисна деградація L-аргініну ферментом аргіназою, що за рахунок обмеження пулів спільного субстрату (L-аргініну) створює умови для одночасної генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  і

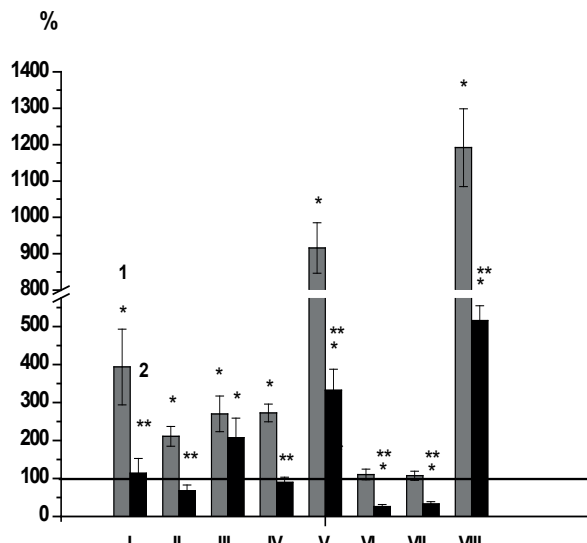


Рис. 3. Вплив піридоксаль-5-фосфату (П5Ф) на показники оксидативного стресу в мітохондріях серця: 1 – контроль; 2 – дія П5Ф; I – швидкість генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ , II – вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$ , III – швидкість генерації  $\cdot\text{OH}$ , IV – вміст малонового діальдегіду, V – вміст дієнових кон'югатів, VI – вміст тромбоксану  $\text{B}_2$ , VII – вміст пептидолейкотрієну  $\text{C}_4$ , VIII – вміст сечової кислоти. \* $P \leq 0,05$  відносно значень у дорослих щурів (100 %); \*\* $P \leq 0,05$  відносно значень у старих щурів

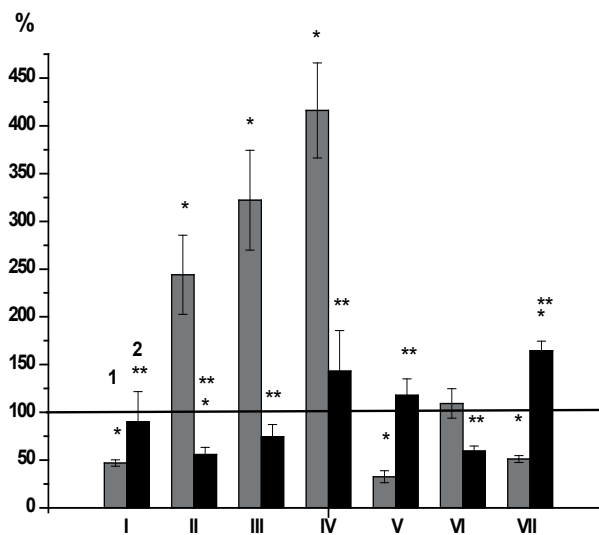


Рис. 4. Вплив піридоксаль-5-фосфату (П5Ф) на показники нітрозативного стресу в мітохондріях серця: 1 – контроль; 2 – дія П5Ф; I – активність конститутивних NO-синтаз, II – активність індукційної NO-синтази, III – активність нітратредуктази, IV – активність аргінази, V – вміст  $\text{NO}_2^-$ , VI – вміст  $\text{NO}_3^-$ , VII – вміст низькомолекулярних нітрозотолів. \* $P \leq 0,05$  відносно значень у дорослих щурів (100 %); \*\* $P \leq 0,05$  відносно значень у старих щурів



оксиду азоту всіма ізоферментами NOS і, тим самим, утворення  $\text{ONOO}^-$  і реалізації його пошкоджувальної дії в кардіоміocyтах і порушення роботи серця в цілому [17]. Стимуляція ендogenous синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  кофактором П5Ф призводила до підвищення активності cNOS у мітохондріях серця у 1,9 раза порівняно із такими у старих тварин. Також пригнічувався синтез NO de novo через зниження активності iNOS у 4,3 раза. Активність нітратредуктази, ферменту, що забезпечує відновлення метаболітів NO –  $\text{NO}_3^-$  і  $\text{NO}_2^-$ , знижувалася у 4,3 раза і, як результат, зменшувалася в 1,8 раза концентрація  $\text{NO}_3^-$ . Вміст  $\text{NO}_2^-$ , який утворюється спонтанно при окисненні NO лише в оксигенованих розчинах, зростав у 3,6 раза порівняно зі значеннями у старих тварин. Пули НМНТ збільшувалися в мітохондріях у 3,2 раза. Цей комплекс включає три компоненти: нітрозильовану амінокислоту L-цистеїн, що є попередником de novo синтезу  $\text{H}_2\text{S}$ , нітрозоглутатіон, що містить у своєму складі L-цистеїн і нітрозильований сірководень. НМНТ беруть участь у транспортуванні і депонуванні NO з вивільненням останнього в процесі декомпозиції. Зниження цих пулів характеризує зменшення інтенсивності процесів нітрозильовання (включення NO) і декомпозиції (вивільнення NO).

У результаті застосування П5Ф спостерігається відновлення спряження cNOS, що супроводжується пригніченням оксидативно-нітрозативного стресу у мітохондріях серця старих щурів. Про це свідчить зростання розрахованого нами індексу спряження до значень  $0,73 \pm 0,38$  ум.од. порівняно зі  $0,083 \pm 0,02$  ум.од у старих тварин ( $P \leq 0,01$ ). Попередні наші дослідження показали, що у мітохондріях серця в умовах старіння суттєво знижувалися значення індексів спряження cNOS [8]. Ми припустили, що причиною відновлення спряженого стану cNOS стало не лише пригнічення оксидативного стресу, але й збільшення біодоступності L-аргініну, субстрату синтезу NO, у результаті зниження активності аргінази в 2,9 раза порівняно зі

старими тваринами (рис.4). Таким чином, одним із можливих кардіопротекторних механізмів дії  $\text{H}_2\text{S}$  можна вважати відновлення спряженого стану cNOS та збільшення нею продукції оксиду азоту, який в свою чергу, пригнічує відкривання МП.

## ВИСНОВКИ

Встановлено, що введення П5Ф призводило до стимуляції синтезу ендogenous  $\text{H}_2\text{S}$  і, як наслідок, до підвищення його вмісту у мітохондріях серця при старінні.

Показано, що застосування кофактора  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезувальних ферментів – П5Ф пригнічувало  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане відкривання МП за допомогою зменшення чутливості до  $\text{Ca}^{2+}$  у серці старих щурів.

Одним із важливих захисних механізмів дії  $\text{H}_2\text{S}$  є значне обмеження генерації активних форм кисню (оксидативного стресу) та азоту (нітрозативного стресу) при старінні, що свідчить про антиоксидантний ефект цього газового трансмітера.

Сірководень виступає як регулятор системи NO, збільшуючи активність cNOS та відновлюючи спряжений стан ферменту, що вказує на важливу його роль у патології серцево-судинної системи.

Л.А. Мысь, Н.А. Струтинская,  
В.Р. Струтинский, В.Ф.Сагач

## АКТИВАЦИЯ СИНТЕЗА ЭНДОГЕННОГО СЕРОВОДОРОДА УГНИТАЕТ ОТКРЫВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ И ВОССТАНАВЛИВАЕТ СОПРЯЖЕНИЕ КОНСТИТУТИВНОЙ NO-СИНТАЗЫ В СЕРДЦЕ СТАРЫХ КРЫС

Изучали влияние кофактора  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезирующих ферментов – пиридоксаль-5-фосфата (П5Ф) на чувствительность митохондриальной поры (МП) к действию естественного ее индуктора  $\text{Ca}^{2+}$  в сердце старых крыс, а также на содержание  $\text{H}_2\text{S}$  и показатели оксидативно-нитрозативного стресса в митохондриях сердца. Показано, что у старых животных развивается оксидативный и нитрозативный стресс, сопровождающийся снижением индекса сопряжения cNOS. Применение П5Ф угнетало  $\text{Ca}^{2+}$ -инду-

цированное открывание МП посредством уменьшения чувствительности к ее индуктору в сердце старых крыс. Использование модулятора синтеза  $H_2S$  повышало содержание сероводорода в 4,2 раза, а также способствовало снижению скорости генерации  $\cdot O_2^-$  в 3,5 раза по сравнению с этими показателями у старых животных. Важным следствием стимуляции эндогенного синтеза сероводорода при старении является повышение активности суммарного конститутивного  $Ca^{2+}$ -зависимого синтеза оксида азота (сNOS) в митохондриях сердца в 1,9 раза и снижение в 4,3 раза активности  $Ca^{2+}$ -независимой iNOS. В этих условиях в индекс сопряжения сNOS повышался в 8,7 раза относительно значений у старых животных. Таким образом,  $H_2S$  выступает как регулятор открывания МП, а также синтеза NO, увеличивая активность сNOS и восстанавливает сопряженное состояние сNOS, что свидетельствует о важной роли этого газового трансммиттера в патологии сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: сероводород; сопряжение сNOS; оксидативно-нитрозативный стресс; старение; митохондрии, сердце, крысы.

**L.A. Mys, N.A. Strutyńska, V.R. Strutyński,  
V.F. Sagach**

#### **ACTIVATION OF ENDOGENOUS HYDROGEN SULFIDE SYNTHESIS INHIBITS MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING AND RESTORES CONSTITUTIVE NO-SYNTHASE COUPLING IN OLD RAT HEART**

We studied the influence of the  $H_2S$  synthesizing enzymes cofactor pyridoxal-5-phosphate on the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening to  $Ca^{2+}$  as natural inducer in old rat heart, as well as the  $H_2S$  content and oxidative and nitrosative stress indicators in heart mitochondria. It was shown that in old rats oxidative and nitrosative stress developed which accompanied by a decrease of the constitutive  $Ca^{2+}$ -dependent NO-synthase (сNOS) coupling index. P5P application inhibited  $Ca^{2+}$ -induced MPTP opening by reducing the sensitivity to the inductor in old rat heart.  $H_2S$  synthesis modulator application led to increase hydrogen sulfide values in 4,2 times and promoted to reduce the  $\cdot O_2^-$  generation speed in 3,5 times in comparison with these indicators in old animals. An important consequence of stimulating of hydrogen sulfide endogenous synthesis in aging was the increase activity of сNOS in 1,9 times and decrease the activity of  $Ca^{2+}$ -independent inducible NO-synthase (iNOS) in 4,3 times in heart mitochondria. Under these conditions in organelles сNOS coupling index increased in 8,7 times relative values in old animals. Thus,  $H_2S$  acts as a regulator of MPTP opening and content NO, increasing activity сNOS and recoverability of enzyme coupled state, indicating the importance of this gaseous transmitter in the pathology of the cardiovascular system.

Keywords: hydrogen sulfide; сNOS coupling; oxidative and nitrosative stress; aging; mitochondria; heart; rats.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv; e-mail: myslida@ukr.net*

#### **REFERENCES**

1. Wang R. Two's company, three's a crowd: can  $H_2S$  be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 2002; 16:1793–8.
2. Rose P, Moore PK, Zhu YZ.  $H_2S$  biosynthesis and catabolism: new insights from molecular studies. *Cell Mol Life Sci.* 2017; 74 (8):1391–1412.
3. Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2015; 91(4):131–59.
4. Wang R. Physiological implication of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev.* 2012; 92(2):791–896.
5. Strutyńska NA, Semenykhina OM, Chorna SV, Vavilova GL, Sagach VF. Hydrogen sulfide Inhibits  $Ca^{2+}$ -induced Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening in Adult and Old Rat Heart. *Fiziol Zh.* 2011; 57(6):3–13. [Ukrainian].
6. Donnarumma E, Trivedi RK, Lefer DJ. Protective Actions of  $H_2S$  in Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. *Compr Physiol.* 201; 7(2):583–602.
7. Mys LA, Budko AYU., Strutyńska NA, Sagach VF. Pyridoxal-5-phosphate restores hydrogen sulfide synthesis and redox state of heart and blood vessels tissue in old animals *Fiziol Zh.* 2017; 63(1):3–9. [Ukrainian].
8. Strutyńska NA, Kotsiuruba AV, Budko AYU, Mys LA, Sagach VF. Mitochondrial dysfunction in the aging heart is accompanied by constitutive NO-synthases uncoupling on the background of oxidative and nitrosative stress. *Fiziol Zh.* 2016; 62(2):3–11. [Ukrainian].
9. Roe ND, Ren J. Nitric oxide synthase uncoupling: A therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vasc Pharm.* 2012; 57:168–72.
10. Li H, Forstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opinion in Pharm.* 2013; 13:1–7.
11. Kwong J, Molkentin J. Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. *Cell Metabolism.* 2015; 21(2):206–14.
12. Sharipov R.R., Kotsiuruba A.V., Kop'iak B.S., Sahach V.F. Induction of oxidative stress in heart mitochondria in brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2014; 60(3):11–7. [Ukrainian].
13. Sharipov R.R., Kotsiuruba A.V., Kop'iak B.S., Sahach V.F. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia-reperfusion of the brain and its correction by ecdysterone. *Fiziol Zh.* 2014; 60(5):3–13. [Ukrainian].
14. Sagach VF, Vavilova GL, Strutyńska NA, Rudyk OV. The aging increase in the sensitivity of the mitochondrial

- permeability transition pore opening to inductors in rat heart. Fiziol Zh. 2004; 50(2):49–63. [Ukrainian].
15. Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. Longev Healthspan. 2014; 3:1–6.
16. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. Nat Protoc. 2010; 5(1): 51–66.
17. Strutynskyi RB, Kotsuruba AV, Rovenets' RA, Strutynska NA, Iagupols'kyi IuL, Sagach VF, Moibenko OO. Biochemical mechanisms of the cardioprotective effect of the K(ATP) channels opener flocalin (medicinal form) in ischemia-reperfusion of myocardium. Fiziol Zh. 2013; 59(4):16–27. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов до  
редакції 16.02.2017*