

Сірководень підвищує акумуляцію кальцію в мітохондріях та пригнічує відкривання циклоспорин А-чутливої мітохондріальної пори в серці щурів

А.Ю. Лучкова, Н.А. Струтинська, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця, НАН України, Київ; e-mail: a.luchkova@biph.kiev.ua

Досліджували H_2S -залежну акумуляцію кальцію в мітохондріях серця щурів за умов функціонування циклоспорин А-чутливої мітохондріальної пори (МП). Активне накопичення Ca^{2+} в органелах відбувалося у разі дії цього катіона у концентраціях $5 \cdot 10^{-5}$ і 10^{-4} моль/л, про що свідчить підвищення флуоресценції кальційчутливого барвника Fluo-4 AM на 46 % максимально. Встановлено, що донор сірководню NaHS у високих концентраціях (10^{-4} моль/л) проявляє інгібувальну, а у низьких (10^{-7} моль/л) активувальну дію на процес акумуляції. Показано, що H_2S мітохондріального походження також впливав на здатність органел накопичувати кальцій і, ймовірно, підвищував їх кальцієву ємність. Так, пригнічення H_2S -синтезувального ферменту 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази її інгібітором о-карбоксиметилгідроксиламіном (О-СМН, 10^{-3} моль/л) вірогідно знижувало інтенсивність флуоресценції. Водночас H_2S , що синтезується в органелах, пригнічував формування кальційіндукованої МП. Отже, зростання H_2S -залежної акумуляції Ca^{2+} не викликає індукції МП, призводить до підвищення кальцієвої ємності органел і, як наслідок, до зниження вмісту цього катіона в цитозолі, що можна розглядати як один із механізмів кардіопротекції.

Ключові слова: сірководень; акумуляція кальцію; мітохондріальна пори; серце; щури.

ВСТУП

Відомо, що сірководень (H_2S) є важливим газомедіатором і регуляторною молекулою в організмі ссавців та виконує чимало функцій у серцево-судинній системі. Так, він розслабляє клітини гладеньких м'язів судин, попереджає розвиток запалення, зумовленого дією цитокінів, стимулює ангиогенез, посилюючи експресію ростового фактора VEGF та активуючи фосфатидилінозитол-3-кіназу [1]. Сірководень також активує ендотеліальну NO-синтазу, попереджає апоптоз кардіоміоцитів, пригнічуючи індукцію каспази-3 та підвищуючи експресію глікогенсинтазкінази-3 β і регулює експресію міРНК [1]. Механізми впливу сірководню різноманітні: відновлення SH-груп білків, дія через протеїнкіназу С та транскрипційний фактор Nrf2, взаємодія з різними типами іонних каналів, зокрема АТФ-залежними та кальцій залежними каліє-

© А.Ю. Лучкова, Н.А. Струтинська, В.Ф. Сагач

вими (K_{ATP} , ВК) каналами [2], а також Ca^{2+} -каналами L- та T-типів [3].

Регуляція сірководнем кальцієвого гомеостазу кардіоміоцитів надзвичайно цікава тема для дослідження, оскільки саме Ca^{2+} забезпечує спряження процесів збудження та скорочення серцевого м'яза і стимулює окисне фосфорилування через активацію дегідрогеназ циклу трикарбонних кислот у мітохондріях [4]. При цьому кальцій також є індуктором відкривання мітохондріальної пори (МП) – неспецифічного міжмембранного каналу мітохондрій, що відіграє важливу роль у запуску апоптозу [5].

Нині відомо, що сірководень захищає мітохондрії від ішемічно-реперфузійного пошкодження [6], інгібує цитохром-с-оксидазу, виступає донором електронів для роботи електронно-транспортного ланцюга при гіпоксії [7]. Проте мало відомо про регуляцію ним кальцієвого гомеостазу в мітохондріях.

У попередніх дослідженнях нами було показано, що екзогенний сірководень сприяє зниженню чутливості МП до кальцію [2], а іншими дослідниками встановлено, що він зменшує вхід кальцію у саркоплазматичний ретикулум, інгібуючи активність Ca^{2+} -АТФази (SERCA) [3]. Важливо зазначити, що у мітохондріях відбувається ендогенний синтез сірководню ферментом 3-меркаптопіруват-сульфуртрансферазою (3-MST). Окрім цього існує два цитоплазматичних ензими: цистатіонін- β -синтаза (CBS) та цистатіонін- γ -ліаза (CSE). Окиснення H_2S до тиосульфатів ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), які надалі перетворюються на сульфіти (SO_3^{2-}) і сульфати (SO_4^{2-}) відбувається також у цих органелах завдяки функціонуванню ферменту сульфатоксидази [8].

Мета нашої роботи – дослідити вплив екзогенного та ендогенного сірководню на акумуляцію Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях та на чутливість МП до кальцію у серці щурів.

МЕТОДИКА

В роботі використовували дорослих (6 міс, 220–250г) щурів лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Дослідження проводили з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування в нашій модифікації [9]. Для цього серця тварин 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, ЕГТА – 1; рН 7,2–7,4. Гомогенат центрифугували двічі за 700 і 11000g (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. Одержану суспензію мітохондрій зберігали при 2 °C. Концентрацію білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [10].

Для дослідження акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями їх навантажували флуоресцентним зондом Fluo-4 AM (2,5 мкмоль/л) у середовищі, яке містило (ммоль/л): KCl – 120, KH_2PO_4 – 3, тріс-НCl – 25, сукцинат Na – 5, Mg^{2+} -АТФ – 3, 0,1 %-й бичачий сироватковий альбумін протягом 30 хв при 26 °C [11]. В середовище додавали комплекс Mg^{2+} -АТФ, що створювало умови, за яких мембранний потенціал генерується лише в результаті гідролізу АТФ ферментом мітохондріальною АТФ-азою без участі дихального ланцюга. Це було зроблено для попередження деполяризації мембрани органел донором сірководню внаслідок часткового інгібування дихального ланцюга, яке впливає на процес акумуляції кальцію [13]. Для покращення процесу навантаження барвник змішували з речовиною Pluronic F-127 (0,02 %-й), як описано у протоколі навантаження для Fluo-3 AM [12]. Вплив H_2S на акумуляцію кальцію в ізольованих мітохондріях вивчали, використовуючи розчинений у бідистильованій воді NaHS у діапазоні концентрацій від 10^{-7} до 10^{-4} моль/л протягом 1 хв. Вимірювання флуоресценції проводили до та після внесення розчину NaHS, а також після додавання CaCl_2 у середовище інкубації на 1, 3, 5, 7, 9, 11-й хвилини. Інгібітор мітохондріального ферменту синтезу сірководню о-карбоксиметилгідроксиламін (О-СМН) використовували у концентрації 10^{-3} моль/л. Вміст білка у пробі становив 0,05 мг/мл.

Реєстрацію накопичення кальцію мітохондріями досліджували з використанням протокового цитофлуориметра Coulter Epics XL («Becton Coulter», США) з аргоним лазером. Створений робочий протокол містив логічне обмеження для реєстрації зразків за прямим та бічним світлорозсіюваннями. Аналіз проб припиняли за умови реєстрації 10 000 подій в обмеженій ділянці.

Для дослідження відкривання МП ізольовані органели поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (кінцевий об'єм – 3 мл) і за допомогою спектрофотометра

реєстрували зниження їх 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 Ca^{2+} та донора сірководню. Її зміни після дії на них NaHS обчислювали як різницю оптичної густини на 1-й та 15-й хвилини набухання. Використовували NaHS у концентрації 10^{-5} моль/л, О-СМН – у діапазоні 10^{-3} – 10^{-5} моль/л. У кожній серії експериментів було використано не менше як 5 тварин. Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програм MS Excel, OriginPro 7.5., FCS Express.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Накопичення ізольованими мітохондріями кальцію та дослідження впливу H_2S на цей процес проводили, використовуючи Ca^{2+} у концентраціях 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ і 10^{-4} моль/л, що становило 0,2, 1 і 2 мкмоль/мг мітохондріального білка. Як видно із рис. 1, акумуляція катіона органелами відбувалася за умов внесення останнього у концентрації $5 \cdot 10^{-5}$ і 10^{-4} моль/л, про що свідчить підвищення флуоресценції кальційчутливого барвника Fluo-4 AM максимально на 46 %. При додаванні 10^{-5} моль/л Ca^{2+} зростання флуоресценції не спостерігалось. Тому у подальших дослідженнях ізольовані органели навантажували ефективними концентраціями катіона, які призводили до посилення флуоресцентного сигналу (див. рис. 1).

Вплив донора сірководню на накопичення кальцію у мітохондріях був неоднозначним (рис. 2). Так, у високій концентрації NaHS (10^{-4} моль/л) частково пригнічував акумуляцію катіона, про що свідчить зниження флуоресценції на 25 %. Подібний ефект спостерігали за дії 10^{-5} моль/л NaHS. Натомість преінкубація мітохондрій з 10^{-6} моль/л NaHS стимулювала накопичення кальцію в ізольованих, навантажених цим катіоном мітохондріях (див. рис. 2, крива 3). NaHS

найбільш ефективно підвищував цей процес в органелах у концентрації 10^{-7} моль/л (рис. 3): інтенсивність флуоресценції підвищувалась у 2 рази (див. рис. 2, крива 4). Варто зазначити, що дія лише NaHS (10^{-7} моль/л) у середовищі, яке містило залишкові кількості кальцію, не впливала на зміну цього показника.

Отже, вплив донора сірководню на кальційакумуляційну здатність ізольованих мітохондрій був дозозалежним, при цьому NaHS у концентрації 10^{-7} моль/л найбільш ефективно сприяв входу Ca^{2+} в мітохондрії. Отриманий результат наших досліджень 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. Сірководень знижує перевантаження цитоплазми клітин судин і серця кальцієм, що підтверджено також даними інших дослідників [14, 15].

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

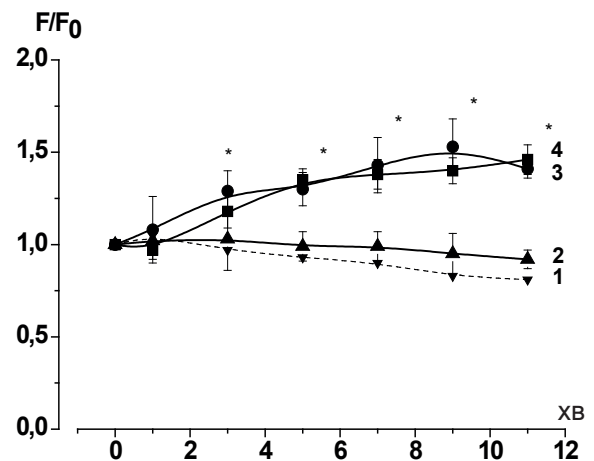


Рис. 1. Накопичення Ca^{2+} мітохондріями серця шурів у середовищі інкубації, що містить залишкові концентрації катіона (1), а також за дії Ca^{2+} у концентраціях 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ і 10^{-4} моль/л (2, 3, 4 відповідно). * $P \leq 0,05$ відносно значень у безкальцієвому середовищі

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 і утворення оксиду азоту (NO), який у свою чергу також запобігає відкриванню МП [2]. Так, встановлено, що активація H_2S -синтезувальних ферментів у старих тварин сприяла відновленню конститутивного синтезу NO в тканинах серця та аорти [16], 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 у разі дослідження 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 5-й хвилині на 28 % (рис. 4, крива 3). Цей ефект, імовірно, супро-

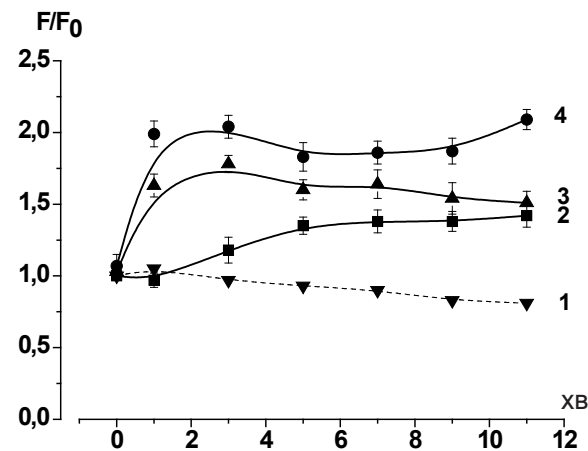


Рис. 2. Вплив донора сірководню NaHS на акумуляцію кальцію у мітохондріях серця щурів: 1 – середовище інкубації містить слідові концентрації Ca^{2+} ; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3 – преінкубація з NaHS (10^{-6} моль/л) і дія Ca^{2+} ; 4 – преінкубація з NaHS (10^{-7} моль/л) і вплив Ca^{2+}

воджувався попередженням Ca^{2+} -індукованого відкривання МП: у результаті дії NaHS у концентрації 10^{-5} моль/л, що становило 25 нмоль/мг білка (рис. 5, крива 4). Таке посилення акумуляції кальцію мітохондріями при їх навантаженні катіоном може бути одним із механізмів вазодилаторного впливу сірководню у різних судинах організму.

Також досліджували участь ендогенного сірководню у регуляції кальцієвого гомеостазу мітохондрій (див. рис. 4). Преінкубація суспензії органел з інгібітором мітохондріального ферменту синтезу сірководню O-CMN (10^{-3} моль/л) вірогідно знижувала акумулювальну і, ймовірно, кальцієву ємність мітохондрій, яка проявлялася у зниженні вмісту кальцію в мітохондріях до кінця експерименту (див. рис. 4, крива 2).

Регуляція кальцієвого обміну в мітохондріях серця ендогенним сірководнем також підтверджується в експериментах *in vitro* з вивчення відкривання МП з використанням цього самого інгібітора. Показано, що преінкубація ізольованих мітохондрій з O-CMN підвищує амплітуду кальційіндукованого

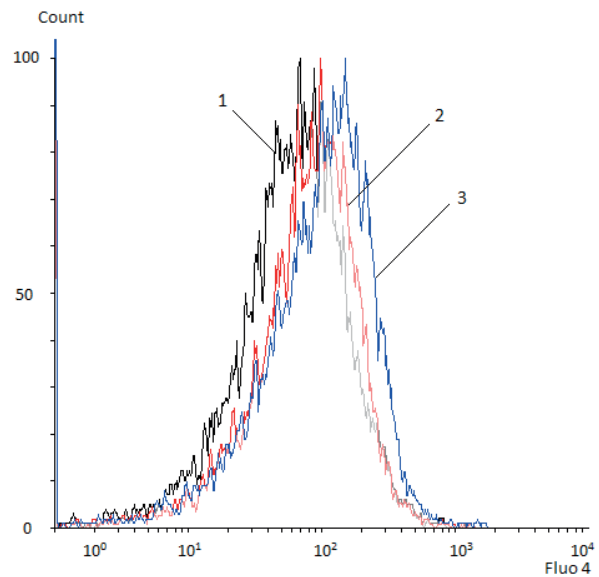


Рис. 3. Нативні криві інтенсивності флуоресценції Fluo-4 AM: 1 – середовище інкубації містить залишкові концентрації Ca^{2+} ; 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3 – преінкубація з NaHS протягом 1 хв (10^{-7} моль/л) і дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л)

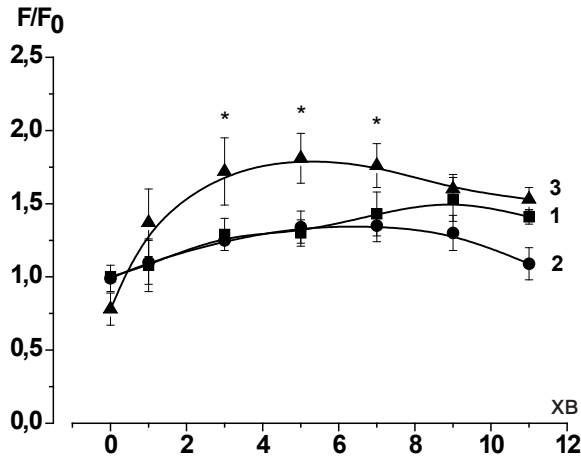


Рис. 4. Вплив NaHS на накопичення Ca²⁺ ізольованими мітохондріями серця шурів: 1 – дія Ca²⁺ (5·10⁻⁵ моль/л); 2 – преінкубація з о-карбоксиметилгідроксиламіном (О-СМН, 10⁻³ моль/л) і дія Ca²⁺; 3 – преінкубація з NaHS (10⁻⁶ моль/л) і дія Ca²⁺. *P≤0,05 відносно значень накопичення Ca²⁺ у концентрації 5·10⁻⁵ моль/л

набухання органел на 20 % (див. рис. 5, крива 3) порівняно з дією кальцію (10⁻⁴ моль/л; див. рис. 5, крива 2). У цій серії експериментів також було використано NaHS (10⁻⁵ моль/л) *in vitro*, який попереджав набухання мітохондрій серця дорослих шурів на 51 %, на тлі

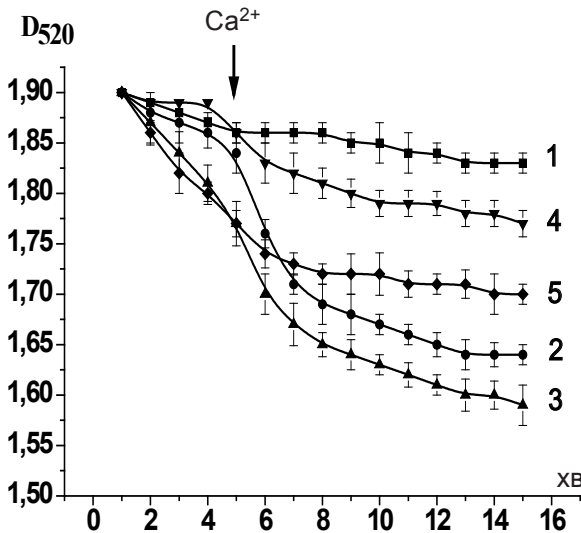


Рис. 5. Дія NaHS та інгібітора синтезу H₂S О-СМН на кальційіндуковане набухання мітохондрій серця шурів: 1 – контроль; 2 – дія Ca²⁺ (10⁻⁴ моль/л); 3 – вплив о-карбоксиметилгідроксиламіну (О-СМН *in vitro*, 10⁻³ моль/л) і дія Ca²⁺; 4 – преінкубація з NaHS (10⁻⁵ моль/л) і дія Ca²⁺; 5 – преінкубація з NaHS, дія Ca²⁺ і О-СМН

дії кальцію. Попередня інкубація органел з О-СМН перешкождала протекторному впливу сірководню на 20 % (див. рис. 5, крива 5).

Виявлено концентраційну залежність впливу О-СМН (10⁻⁵–10⁻³ моль/л) на набухання нативних мітохондрій у середовищі з низьким вмістом кальцію (рис. 6). Таке помірне набухання мітохондрій за умов дії інгібітора і без впливу індуктора МП Ca²⁺ попереджалося селективним інгібітором МП циклоспорином А (10⁻⁵ моль/л), що підтверджує залучення МП до процесу набухання мітохондрій і регуляцію її відкриття сірководнем, який синтезується в мітохондріях.

Отже, ендогенний сірководень мітохондріального походження бере участь у регуляції відкриття МП. Пригнічення H₂S-синтезувального ферменту 3-MST призводить до підвищення Ca²⁺-індукованого набухання МП. Натомість додавання сірководню на тлі дії цього інгібітора попереджає відкриття кальційіндукованої МП, що свідчить про коригувальну дію екзогенного H₂S. Таким чином, зовнішньо- і внутрішньомітохондрі-

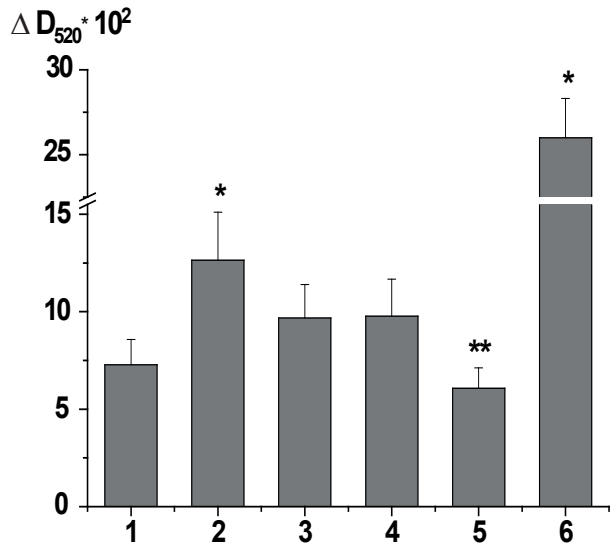


Рис. 6. Вплив інгібітора ферменту синтезу H₂S о-карбоксиметилгідроксиламіну (О-СМН) на набухання мітохондрій серця шурів у безкальцієвому середовищі: 1 – контроль, 2, 3, 4 – дія О-СМН (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ моль/л відповідно), 5 – преінкубація з циклоспорином (10⁻⁵ моль/л) і дія О-СМН (10⁻³ моль/л), 6 – дія Ca²⁺ (10⁻⁴ моль/л). *P≤0,05 відносно значень у контролі, **P≤0,05 відносно значень за впливу О-СМН 10⁻³ моль/л

альний сірководень, впливаючи на функціонування каналних структур органел, а саме мітохондріального кальцієвого уніпортера та МП, регулює тим самим обмін Ca^{2+} в органелах.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що існує певний дуалізм стосовно наслідків дії H_2S на акумуляцію Ca^{2+} : залежно від вмісту останнього в середовищі інкубації (навколомітохондріальному просторі) він проявляв пригнічувальну (у високих концентраціях) чи активувальну (у низьких) дію.

2. На здатність мітохондрій збільшувати акумуляцію кальцію і, ймовірно, їх кальцієву ємність, впливав як зовнішньо- так і внутрішньомітохондріальний сірководень, про що свідчать результати досліджень із експозицією екзогенного сірководню та пригніченням його синтезу в органелах.

3. Ендогенний сірководень мітохондріального походження контролює (запобігає) формуванню циклоспорин А-чутливої МП. Преінкубація ізольованих мітохондрій з О-СМН підвищувала амплітуду Ca^{2+} -набування органел на 20 %. За відсутності Ca^{2+} О-СМН викликав помірне набування мітохондрій, яке попереджалося циклоспорином А (10^{-5} моль/л).

4. Отже, у разі дії сірководню, помірне зростання акумуляції Ca^{2+} в мітохондріях супроводжувалося пригніченням МП, що ймовірно призводить до підвищення кальцієвої ємності органел і зниження концентрації цього катіона в цитозолі. Цей ефект можна розглядати як один із механізмів кардіопротекції.

А.Ю. Лучкова, Н.А. Струтинская, В.Ф. Сагач

СЕРОВОДОРОД ПОВЫШАЕТ АККУМУЛЯЦИЮ Ca^{2+} В МИТОХОНДРИЯХ И УГНЕТАЕТ ОТКРЫВАНИЕ ЦИКЛОСПОРИН А-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ В СЕРДЦЕ КРЫС

Исследовали H_2S -зависимую акумуляцию кальция в митохондриях сердца крыс в условиях функционирования циклоспорин А-чувствительной митохондриальной поры (МП). Активное накопление Ca^{2+} в органеллах происхо-

дило при действии этого катиона в концентрациях $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} моль/л, о чем свидетельствует повышение флуоресценции кальцийчувствительного красителя Fluo-4 AM на 46% максимально. Установлено, что донор сероводорода NaHS в высоких концентрациях (10^{-4} моль/л) проявлял ингибирующее, а в низких (10^{-7} моль/л) активирующее воздействие на процесс аккумуляции. Показано, что H_2S митохондриального происхождения также влиял на способность органелл накапливать кальций и, вероятно, повышал их кальциевую емкость. Так, угнетение H_2S -синтезирующего фермента 3-меркаптопируватсульфуртрансферазы ее ингибитором о карбоксиметилгидроксиламино (О-СМН, 10^{-3} моль/л) достоверно снижало интенсивность флуоресценции. В то же время H_2S , синтезируемый в органеллах, подавлял формирования кальцийиндуцированной МП. Таким образом, рост H_2S -зависимой аккумуляции Ca^{2+} не вызывает индукции МП, приводит к повышению кальциевой емкости органелл и, как следствие, к снижению содержания этого катиона в цитозоле, что можно рассматривать как один из механизмов кардиопротекции. Ключевые слова: сероводород; акумуляция кальция; митохондриальная пора; сердце; крысы.

A.Yu. Luchkova, N.A. Strutynska, V.F. Sagach

HYDROGEN SULFIDE INCREASES CALCIUM ACCUMULATION IN CARDIAC MITOCHONDRIA AND PREVENTS CYCLOSPORINE A-SENSITIVE MITOCHONDRIAL PORE IN RAT HEART

We were studied H_2S -dependent calcium accumulation in cardiac mitochondria in condition when cyclosporine A-sensitive mitochondrial permeability transition pore (MPTP) was not inhibited. An active Ca^{2+} accumulation in organelles occurs if it was used calcium in concentration of $5 \cdot 10^{-5}$ and 10^{-4} mol/l, as evidenced by the increase of Fluo-4 AM fluorescence by 46 %. It is established that hydrogen sulfide donor NaHS showed inhibitory effect at high concentrations (10^{-4} mol/l) and activating effect at low (10^{-7} mol/l) concentrations on the calcium accumulation process. It was shown that mitochondrial origin H_2S also influences the mitochondrial ability to accumulate calcium and probably increases their calcium capacity. Thus, inhibition of H_2S synthesis enzyme 3-mercaptopyruvate-sulfurtransferase by its inhibitor O-carboxymethyl-hydroxylamine (O-CMH, 10^{-3} mol/l) significantly reduced the rate of fluorescence. However, H_2S , which is synthesized in organelles, inhibited the formation of calcium induced MP. Thus, the increase of H_2S -dependent Ca^{2+} accumulation does not causes induction of MPTP and likely leads to increase of mitochondrial calcium capacity and, consequently, to the reduction of this cation in the cytoplasm, which can be regarded as one of the mechanisms for cardioprotection.

Keywords: hydrogen sulfide; accumulation of calcium; mitochondrial pore; heart; rats.

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

REFERENCES

1. Shen Y, Shen Z, Shanshan Luo, Wei Guo, and Yi Zhun Zhu. The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. *Ox Med and Cell Long*. 2012; 1–14.
2. Strutynska NA, Semenykhina OM, Chorna SV, Vavilova GL, Sagach VF. Hydrogen sulfide inhibits Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart. *Fiziol Zh*. 2011; 57(6):3–14. [Ukrainian].
3. Munaron L, Avanzato D, Moccia F, Mancardi D. Hydrogen sulfide as a regulator of calcium channels. *Cell Calcium*. 2013; 53:77–84.
4. Glancy B, Balaban RS. Role of Mitochondrial Ca²⁺ in the Regulation of Cellular Energetics. *Biochemistry*. 2012; 51:2959–73.
5. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol. and Cell Card*. 2015; 78: 100–6.
6. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow CW, Lefter DJ. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(39):15560–5.
7. Fu M, Zhang W, Wu L, Yang G, Li H, Wang R. Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *PNAS*. 2012; 109(8):2943–8.
8. Guo W, Kan J, Cheng Z, Chen J, Shen Y, Xu J, Wu D, Zhu Y. Hydrogen Sulfide as an Endogenous Modulator in Mitochondria and Mitochondria Dysfunction. *Ox Med and Cell Long*. 2012; 1–9.
9. Sagach VF, Vavilova GL, Strutyns'ka 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].
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; (1):265–75.
11. Budko AYU, Strutynska NA, Okhay IYu, Semenykhina OM, Sagach VF. Ca²⁺ accumulation in isolated rat heart mitochondria under maintenance of mitochondrial potential. *Fiziol Zh*. 2015; 61(6):17–25. [Ukrainian].
12. Kolomiets OV, Danylovykh YuV, Danylovykh GV, Kosterin SO. Ca²⁺ accumulation study in isolated smooth muscle mitochondria using Fluo-4 AM. *Ukr Biochem J*. 2013; 85(4):30–9. [Ukrainian].
13. Akopova OV, Kotsiuruba AV, Tkachenko YuP, Sagach VF. Nitric oxide suppresses permeability transition pore opening and enhances calcium uptake in mitochondria in vivo. *Fiziol Zh*. 2005; 51(3):3–11. [Ukrainian].
14. Pan TT, Neo KL, Hu LF, Yong QC, Bian J-S. H₂S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes. *Am. J Physiol Cell Physiol*. 2008; 294:169–77.
15. Chen Y, Zhao J, Du J, Xu G, Tang Ch, Geng B. Hydrogen sulfide regulates cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake via KATP channel and PI3K/Akt pathway. *Life Sciences*. 2012; 91:271–8.
16. Mys LA, Budko AYU, Strutynska NA, Sagach VF. Pyridoxal-5-phosphate restores hydrogen sulphide synthesis and redox state of heart and blood vessels tissue in old animals. *Fiziol Zh*. 2017; 63(1). [Ukrainian].

Матеріал надійшов до редакції 16.02.2017