

# **L-цистеїн стимулює ендогенний синтез сірководню, пригнічує окисний стрес і відкривання мітохондріальної пори у серці старих щурів**

**Н.А. Струтинська, Ю.П. Коркач, Л.А. Мись, А.Ю. Лучкова, В.Ф. Сагач**

*Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: na-strutynska@biph.kiev.ua*

*Досліджували вплив амінокислоти L-цистеїну на вміст сірководню, показники окисного стресу та кінетичні характеристики  $Ca^{2+}$ -індукованого набухання мітохондрій у серці старих щурів. Показано, що одноразове введення їм L-цистеїну (121 мг/кг) пригнічувало спонтанне і  $Ca^{2+}$ -індуковане набухання мітохондрій, що проявлялось у зниженні амплітуди цих процесів і свідчило про запобігання пороутворенню у серці. При старінні знижувалися мітохондріальні пули сірководню на тлі порушення конститутивного, суттєвого підвищення індуцибельного та реутилізаційного синтезу NO. Застосування L-цистеїну призводило до зростання у 2,56 раза вмісту сірководню у мітохондріях серця старих тварин ( $6,015 \pm 0,74$  нмоль/мг білка) порівняно з такими без введення амінокислоти ( $2,35 \pm 0,25$  нмоль/мг білка). Отже, за цих умов відновлювався синтез сірководню в мітохондріях, імовірно, внаслідок активації  $H_2S$ -синтизувальних ферментів їх субстратом, що сприяло достовірному пригніченню індуцибельного синтезу NO у 1,73 раза та зниженню вдвічі активності нітратредуктази і аргінази. При введенні амінокислоти старим тваринам знижувалися у 1,5 раза пули сечової кислоти, що може свідчити про пригнічення утворення супероксидного радикала, а також суттєво зменшувалася вміст дієнових кон'югатів (у 7 разів), що вказує на пригнічення окисного стресу на ранніх етапах перекисного окиснення ліпідів. Таким чином, результати досліджень свідчать про участь L-цистеїну у стимуляції ендогенного синтезу сірководню в мітохондріях, що сприяє зниженню окисативного стресу в органах і модуляції змін проникності мітохондріальних мембран. Цей факт говорить про важливість газового трансмітера сірководню як регуляторного фактора у серцево-судинній системі, що здійснює модуляторний контроль над функціями клітини та їх органами.*

*Ключові слова: L-цистеїн; сірководень; окисний стрес; неспецифічна мітохондріальна пора; старіння.*

## **ВСТУП**

Основним субстратом для синтезу сірководню в організмі ссавців є L-цистеїн. Це заміна амінокислота, що може вивільнятися з білків або бути синтезованою з ендогенних амінокислот, наприклад із серину за участю L-метіоніну як джерела сірки, а також надходить в організм з продуктами харчування. Нині відомо, що L-цистеїн регулює метаболічні процеси в організмі, окисний стрес, фізіологічні сигнальні шляхи та супутні захворювання через продукцію трипептиду глутатіону та амінокислоти таурину [1].

Наразі особливий інтерес представляють і активно досліджуються ефекти газоподібної біологічно активної молекули сірководню ( $H_2S$ ), що ендогенно синтезується в організмі за допомогою ферментів цистатіонін- $\beta$ -синтази (cystathionine  $\beta$ -synthase – CBS), цистатіонін- $\gamma$ -ліази (cystathionine  $\gamma$ -lyase – CSE), а також 3-меркаптопівурватсульфуртрансферази (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase – 3-MST) разом з цистеїнамінотрасферазою (cysteine aminotransferase – CAT). CBS і CSE знаходяться в цитоплазмі клітин і використовують піридоксаль-5-фосфат як кофермент, тоді

© Н.А. Струтинська, Ю.В. Коркач, Л.А. Мись, А.Ю. Лучкова, В.Ф. Сагач

як 3-MST має цитоплазматичну і мітохондріальну локалізацію. CAT також є піридоксаль-5-фосфатозалежним ферментом. Саме амінокислота L-цистеїн слугує субстратом для синтезу сульфїду водню цими ензимами. Так, CBS і CSE метаболізують цистеїн і/або гомоцистеїн, продукуючи при цьому  $H_2S$ , тоді як 3-MST синтезує сірководень з 3-меркаптопіривату, який утворюється ферментом CAT з цистеїну та  $\alpha$ -кетоглутарату. Відомо також, що 3-MST потребує кофакторів, зокрема тіоредоксину та дигідроліпоєвої кислоти, а також регулюється кальцієм [2, 3].

У наших попередніх дослідженнях показано, що одноразове введення L-цистеїну зменшує реперфузійні пошкодження ізольованого серця після ішемії [4]. Амінокислота покращувала ендотелійзалежну релаксацію кілець аорти, і цей ефект був нівельований при видаленні періадвентиціальної жирової тканини [5]. При старінні разом з посиленням оксидативно-нітрозативного стресу, також зменшується ендogenousний синтез  $H_2S$ , зокрема в мітохондріях і тканині серця загалом, що в сукупності призводить до підвищення чутливості неспецифічної мітохондріальної пори (МП) до її природного активатора кальцію, і є однією з причин розвитку низки патологічних станів організму [6, 7]. Тому було б цікаво дослідити чи додаткове введення старим тваринам L-цистеїну модулює продукцію сірководню та рівень окисних процесів у мітохондріях. Адже ці органели вважаються однією з головних мішеней дії  $H_2S$ , який впливає на мітохондріальне дихання, апоптоз та їх біогенез. Відомо, що сірководень у низьких, не токсичних концентраціях сприяє біогенезу та функціонуванню мітохондрій, тим самим попереджуючи загибель клітин [8]. Він безпосередньо впливає на активність електронно-транспортного ланцюга (ЕТЛ), діючи як субстрат чи антагоніст цитохром-*c*-оксидази. Так, у концентраціях менше ніж 20 мкмоль/л  $H_2S$  може виступати єдиним неорганічним субстратом, слугуючи донором електрона для ЕТЛ за допомогою фермента сульфідхінонок-

сидоредуктази (SQR). Електрони, вивільнені при окисненні  $H_2S$ , захоплюються убихіноном і передаються по дихальному ланцюгу до комплексу III для подальшого поширення. Ця активність, ймовірно, стимулює фосфорилування та продукцію АТФ у клітинах. Однак з підвищенням вмісту  $H_2S$  інгібіторний вплив на ЕТЛ може пересилювати його стимулюючу дію до цілковитого пригнічення функціонування мітохондрій. Концентрації, які потрібні для повного інгібування цитохром-*c*-оксидази в різних моделях залежать від таких факторів, як тип клітини та клітинне середовище. За цих умов  $H_2S$  є високоцитотоксичним, оскільки пригнічує активність ЕТЛ, знижує вміст внутрішньоклітинного АТФ, посилює генерацію АФК, індукує мітохондріальну деполяризацію та апоптоз. Крім того, у високих концентраціях він додатково інгібує вироблення АТФ за допомогою регуляції роз'єднувального білка 2 (UCP 2), який розсіює градієнт протонів і призводить до порушення синтезу АТФ. Припускають, що завдяки цим процесам клітини можуть адаптуватися до високих концентрацій  $H_2S$  [8].

Відомо, що порушення ендogenousного синтезу  $H_2S$  супроводжують розвиток таких патологічних станів, як гіпертензія, атеросклероз, діабет, серцева недостатність, нейродегенеративні захворювання тощо. Більшість із цих станів характерні і частіше всього розвиваються у старих організмах, у яких синтез сірководню суттєво знижений [9, 10]. Таким чином, при зниженні ендogenousної продукції сірководню, що спостерігається при старінні, проблема активації синтезу цього газового трансмітера та відновлення активності  $H_2S$ -синтезувальних ферментів набуває неабиякої актуальності. Припускаємо, що відновлення знижених концентрацій  $H_2S$  сприятиме посиленню мітохондріального метаболізму, збереженню їх функції, а також цитопротекції в серцево-судинній системі в цілому.

Метою нашої роботи було дослідити ефекти одноразового введення L-цистеї-

ну старим тваринам на вміст сірководню, біохімічні показниками, що характеризують інтенсивність окисних процесів, та процес кальційіндукованого набухання мітохондрій у серці.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, 220–250 г) і старих (22–24 міс, 300–350 г) щурах лінії Вістар. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. У кожній серії дослідів використано не менше ніж 10–12 тварин. У дослідженнях дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986). Тварин було поділено на три групи: I (контрольна) група – дорослі щури, II група – старі щури, III група – старі щури, яким одноразово внутрішньоочеревино вводили розчин амінокислоти L-цистеїну у дозі 121 мг/кг за 30 хв до декапітації.

Серця, видалені з декапітованих щурів, промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (4°C). Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [6]. Кінетику їх набухання оцінювали за допомогою спектрофотометричної реєстрації оптичної густини суспензії органел. Для цього органели поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс – HCl – 25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при  $\lambda = 520$  нм впродовж 15 хв за наявності індуктора  $\text{Ca}^{2+}$ . Концентрація білка становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі без додавання кальцію, при цьому обраховували амплітуду спонтанного (контрольного) набухання як різницю значень оптичної густини від 1-ї до 15-ї хв ( $A_0 = \Delta D_{520}/\text{мг}$  білка). Максимальну амплітуду вимірювали за умов активації пороутворення при дії індуктора МП – іонів кальцію ( $A_{\text{max}} = \Delta D_{520}/\text{мг}$  білка).

В ізолюваних мітохондріях серця, до та після введення попередника *de novo* синтезу  $\text{H}_2\text{S}$ , за допомогою спектрофотометра фіксували зміни вмісту ендogenous  $\text{H}_2\text{S}$  та активність усіх трьох шляхів синтезу NO – індукцибельного (iNOS), конститутивного (cNOS) та неокисного реутилізаційного (нітратредуктаза) на тлі інтенсивності окисного (оксидативного) метаболізму. Вміст  $\text{H}_2\text{S}$  визначали таким чином: до аліквот проб додавали 0,5 мл 1%-го розчину ацетату цинку, інкубували при 37,5°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  $\text{FeCl}_3$ . Після 10 хв інкубації в темряві на холоді визначали оптичну густину при  $\lambda = 670$  нм [11]. Активність різних ізоферментів NOS, як нітрозативної компоненти окисного стресу,  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної iNOS та  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної cNOS визначали за утворенням L-цитруліну, фіксуючи оптичну густину інкубаційної суміші при  $\lambda = 492$  нм. Активність cNOS розраховувалася за наявності 2 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , iNOS – 5 ммоль/л EDTA. Активність ферментів виражалася у пікомолях новоутвореного L-цитруліну протягом 1 хв на 1 мг загального білка в пробі [12]. Метод визначення активності нітратредуктази базувався на здатності ензиму за наявності надлишку НАДН відновлювати нітрат-аніон ( $\text{NO}_3^-$ ) до нітрит-аніона ( $\text{NO}_2^-$ ) [13]. Аргіназу активність визначали за утворенням сечовини в інкубаційній суміші, що містила аліквоти проб та L-аргінін у тріс-HCl-буфері (рН 7,4) [14]. Мітохондріальні пули  $\text{NO}_2^-$  визначали за допомогою реактиву Гріса методом Гріна [15],  $\text{NO}_3^-$  – бруциновим реактивом, який додавали до безбілкової аліквоти проб та інкубували при 100°C протягом 10 хв, після чого охолоджували і вимірювали значення екстинції при  $\lambda = 405$  нм [16].

Інтенсивність оксидативної компоненти окисного стресу в мітохондріях серця старих щурів оцінювали за змінами пулів як одного із ранніх продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів (ДК), так і кінцевих – малонового

діальдегіду (МДА). Методика визначення вмісту ДК включала екстракцію ліпідів зі зразків за допомогою органічних розчинників (гептан/ізопропанол 1:1) і зміни екстинції при  $\lambda = 232$  нм [17]. Вміст 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  $15600 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [18]. Вміст ейкозаноїдів – тромбоксану В2 (ТхВ2) і лейкотрієну С4 (LTC<sub>4</sub>) визначали в спиртових екстрактах за допомогою радіоімунного методу, користуючись стандартними добірками реактивів «Amersham» (Англія). Радіоактивність проб вимірювали на лічильнику фірми «Baskman» (Німеччина). Вміст сечової кислоти вимірювали в колориметричній реакції в аліквотах проб ізольованих мітохондрій за допомогою добірки реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Дніпропетровськ, Україна). Вміст сечової кислоти в пробах розраховували за екстинцією стандартного її розчину. Концентрацію загального білка мітохондрій визначали за методом Лоурі [19].

Експериментальні результати перевіряли на нормальність розподілу за допомогою критерію Шапіро–Уїлка. Їх обробляли методами варіаційної статистики з використанням програми Origin 7.0 («Microcall Inc.», США). Міжгрупові різниці між показниками визначали за допомогою критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 представлено типові кінетичні криві зміни оптичної густини суспензії мітохондрій серця дорослих щурів у середовищі без кальцію та при додаванні цього універсального активатора МП у концентрації  $10^{-4}$  моль/л, а також у старих щурів за умов одноразового введення попередника ендогенного синтезу сірководню амінокислоти L-цистеїну. Пока-

зано, що кінетичні криві мали нелінійний характер з виходом на плато, що свідчить про обмеження процесу набухання мітохондрій. Слід відзначити, що у фазі, коли набухання сягало постійних значень оптичної густини, встановлювався рівноважний стан, за якого відкривання неспецифічних пор було максимальним. За зміною оптичної густини було обчислено амплітуди спонтанного чи контрольного ( $A_c$ ) та кальційзалежного ( $A_{\text{max}}$ ) набухання мітохондрій. Значення контрольного набухання в перерахунок на вміст білка для дорослих, старих щурів, а також із введенням L-цистеїну старим тваринам становило  $0,17 \pm 0,005$ ;  $0,28 \pm 0,011$  і  $0,22 \pm 0,008$  од. екст./мг білка відповідно; при цьому максимальні значення набухання органел, що включають в себе як пасивну, так кальційзалежну його компоненти, становили  $0,43 \pm 0,012$ ;  $0,56 \pm 0,016$  і  $0,47 \pm 0,009$  од. екст./мг білка відповідно для трьох вищезазначених груп тварин. Отже, додавання розчину CaCl<sub>2</sub> до мітохондрій серця щурів, що інкубували в середовищі за наявності неорганічного фосфату (P<sub>i</sub>) і енергізованих окисненням сукцинату, призводило до істотного зниження оптичної густини і обрахованої  $A_{\text{max}}$  суспензії мітохондрій старих щурів порівняно з дорослими і характеризувалося як високоамплітудне. Графіки залежності оптичної густини від часу інкубації мітохондрій серця старих щурів при впливі L-цистеїну відрізнялися: зменшувалося набухання мітохондрій як у безкальцієвому середовищі, так і за умов дії цього індуктора, що свідчило про мітопротективні ефекти амінокислоти.

Отримані результати узгоджуються з літературними джерелами, які свідчать про формування за наявності P<sub>i</sub> Ca<sup>2+</sup>-залежної МП у мембранах органел серця тварин. МП є мультибілковим комплексом, який пронизує внутрішню мембрану мітохондрій, і утворюється як за фізіологічних, так і патологічних умов. Цей комплекс складається зі структурних каналоутворювальних і регуляторних білків. Нещодавно було виявлено, що F1F0 АТФ-синтаза може бути внутрішньомемб-

ранною пороутворювальною субодиноцею МП [20]. Отже, ми показали, що попередник ендогенного синтезу сірководню L-цистеїн запобігав збільшеному спонтанному і  $Ca^{+2}$ -індукованому набуханню мітохондрій, що свідчить про запобігання пороутворенню у серці при старінні.

Для встановлення можливих біохімічних механізмів впливу L-цистеїну на рівні мітохондрій були проведені дослідження пулів  $H_2S$  та показників оксидативного стресу в органелах серця щурів при старінні. У мітохондріях серця дорослих і старих щурів визначили базальний вміст ендогенно синтезованого сірководню, який становив  $4,48 \pm 0,44$  та  $2,35 \pm 0,25$  нмоль/мг білка відповідно (рис. 2), що свідчило про його зниження (в 1,91 раза,  $P < 0,05$ ) при старінні. У разі введення старим щурам L-цистеїну, як субстрату системи мітохондріальних  $H_2S$ -синтезувальних ферментів, виявили зростання пулів  $H_2S$  у мітохондріях серця до  $6,02 \pm 0,74$  нмоль/мг білка, що було в 2,56 раза ( $P < 0,05$ ) більше порівняно зі значеннями у старих тварин. Отже, нами доведено, що в мітохондріях, які є місцем як синтезу сірководню, так і його деградації, пригнічується ендогенний синтез  $H_2S$  при старінні, можливо при цьому активу-

ється процес деградації (окиснення до іонів сульфату в органелах ферментом сульфідоксидазою). Інтенсифікація останнього процесу в мітохондріях серця старих щурів може бути як спосіб адаптивного використання додаткового джерела енергії (синтезу АТФ) за рахунок процесів послідовного окиснення ендогенних пулів  $H_2S$  мітохондріальною сульфідоксидазою на кінцевому етапі його біосинтезу. Таким чином, після одноразового введення старим щурам попередника *de novo* синтезу  $H_2S$  L-цистеїну спостерігали відновлення внутрішньомітохондріальних пулів  $H_2S$ . Отже, серце є важливим джерелом утворення ендогенного  $H_2S$ , який може впливати, зокрема, і на функціонування мітохондрій, попереджуючи відкривання МП.

Як видно із табл. 1, у мітохондріях серця старих щурів пригнічувався у 3,18 раза ( $P < 0,05$ ) конститутивний синтез NO кальційзалежними ізоферментами cNOS на тлі суттєвого підвищення (у 7,63 раза,  $P < 0,05$ ) активності більш потужного індукібельного синтезу NO ізоферментом iNOS порівняно з контролем. Отже, значне підвищення продукції оксиду азоту відбувалася внаслідок надмірної активності iNOS, а не cNOS. За цих умов надлишковий NO при одночасній гене-

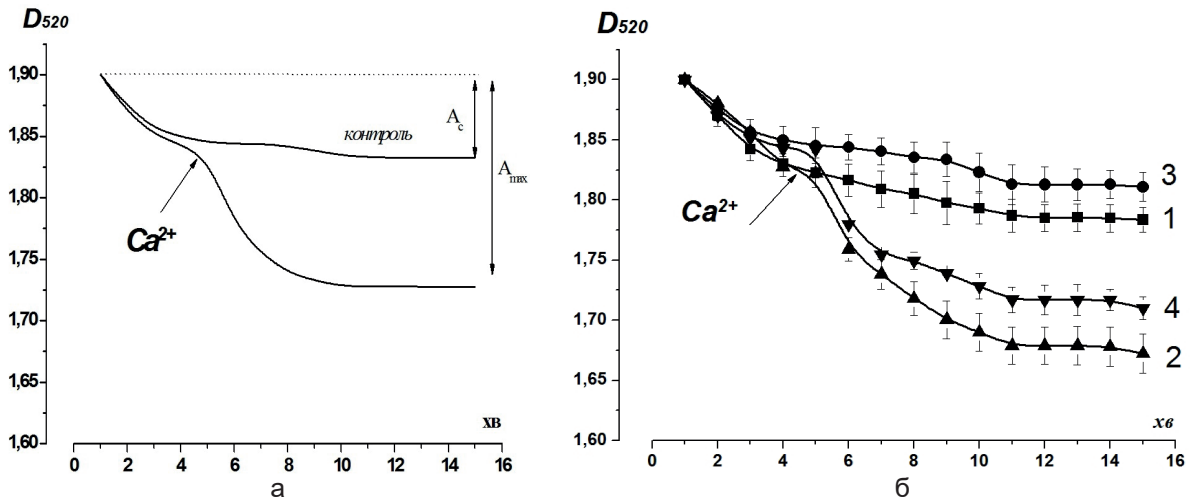


Рис. 1. Динаміка набухання мітохондрій серця дорослих (а) і старих (б) щурів: 1 – у середовищі без кальцію; 2 – при дії  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л); 3, 4 – за умов введення *in vivo* попередника синтезу сірководню L-цистеїну старим тваринам без та за дії кальцію відповідно



Таблиця 1. Активація різних шляхів синтезу NO в мітохондріях серця старих щурів за дії L-цистеїну (121 мг/кг; M ± m)

Показник	Дорослі щури	Старі щури	Старі щури і дія L-цистеїну
NO-синтази, нмоль·хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка			
конститутивна	5,85 ± 1,12	1,84 ± 0,26*	1,93 ± 0,40*
індуцибельна	1,61 ± 0,12	12,29 ± 1,11*	7,09 ± 1,38***
Нітратредуктаза, нмоль·хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка	0,59 ± 0,04	3,31 ± 0,41*	1,62 ± 0,29***
Аргіназа II, нмоль·хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка	1,18 ± 0,19	8,35 ± 0,56*	4,21 ± 0,59***

Примітка тут і в табл. 2: \*P < 0,05 відносно значень у дорослих тварин; \*\*\*P < 0,05 відносно значень у старих щурів.

рації з супероксидним радикалом ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) може призводити до утворення пероксинітриду ( $\text{ONOO}^-$ ) з подальшою активацією нітрозативного стресу, що водночас з посиленням окисного метаболізму є причиною суттєвих пошкоджень мітохондрій, а саме відкривання МП та ініціацією апоптозу кардіоміоцитів у серці старих щурів. При введенні старим тваринам L-цистеїну не відбувалося достовірного підвищення конститутивного синтезу NO, натомість активність індуцибельного у 1,73 раза (P < 0,05) пригнічувалася (див. табл. 1).

При старінні в мітохондріях серця щурів також значно активувався як реутилізаційний шлях синтезу NO (у 5,61 раза, P < 0,05) внаслідок підвищення активності першого

ферменту двоетапного відновлення основного стабільного метаболіту NO – нітрату нітрат- і нітрит-редуктазами, так і неокисний процес метаболізму L-аргініну, про що свідчить підвищення в 7,07 раза (P < 0,05) активності аргінази II порівняно зі значеннями у контрольних дорослих тварин (див. табл. 1). L-цистеїн вдвічі знижував активності як мітохондріальної нітратредуктази, так і аргінази II – ферменту метаболізму/деградації L-аргініну, що є також субстратом для синтезу NO (див. табл. 1).

$\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  – це стабільні продукти метаболізму оксиду азоту. При цьому  $\text{NO}_2^-$  є маркером доступності кисню для спонтанного неферментативного окиснення NO, а

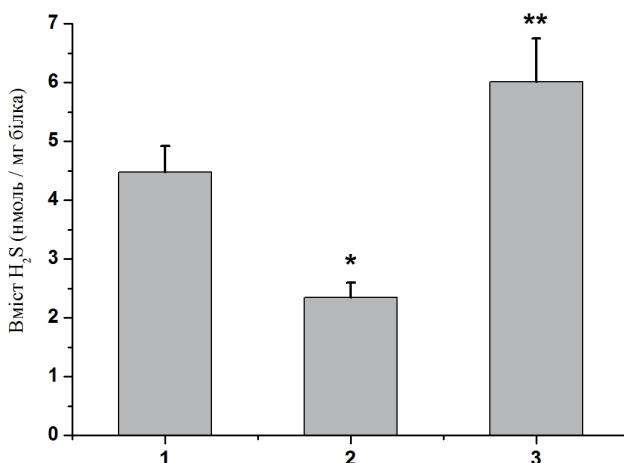


Рис. 2. Вміст сірководню у мітохондріях серця дорослих (1) та старих (2) щурів, а також при введенні *in vivo* попередника синтезу сірководню L-цистеїну (3) старим тваринам. \*P < 0,05 відносно значень у дорослих тварин, \*\*P < 0,05 відносно значень у старих тварин

$\text{NO}_3^-$  – показник утворення і розпаду пероксинітриту. Ми показали, що в мітохондріях серця при старінні знижувалися у 1,86 раза пули  $\text{NO}_2^-$  порівняно зі значеннями у дорослих тварин (з  $246,76 \pm 31,6$  до  $132,40 \pm 12,7$  пмоль/мг білка), однак пули  $\text{NO}_3^-$  ( $92,8 \pm 10,2$  пмоль/мг білка) достовірно не змінювалися порівняно з контролем ( $68,86 \pm 15,53$  пмоль/мг білка). Досліджуваний попередник синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  не змінював пули стабільних метаболітів  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ .

Як видно із табл. 2, при старінні в мітохондріях серця щурів розвивається оксидативний стрес. На це вказує підвищений вміст сечової кислоти і ейкозаноїдів –  $\text{LTC}_4$  та  $\text{TxB}_2$ , що є маркерами утворення  $\text{O}_2^-$  відповідними оксидазами – ксантинооксидазою, ліпоксигеназою та циклооксигеназою. Введення старим щурам L-цистеїну достовірно знижувало пули сечової кислоти (в 1,5 раза) у мітохондріях серця, що є доказом ефективного інгібування генерації  $\text{O}_2^-$ . Оцінюючи результати, що представлені в табл. 2, можемо засвідчити, що процес старіння супроводжується не лише інтенсифікацією оксидативного стресу, а й активацією процесу ПОЛ мембран. Так, у мітохондріях серця старих щурів пули ДК, що є ранніми продуктами ПОЛ, підвищувалися в 2,19 раза ( $P \leq 0,05$ ), а вміст кінцевого продукту цього процесу – МДА в 2,6 раза ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. Антиоксидантна дія попередника синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  полягала в ефективному зниженні пулів ДК у 7 разів

( $P < 0,05$ ) відносно значень у старих щурів, що було нижче навіть від контрольних значень. При цьому концентрація МДА в мітохондріях серця старих тварин знижувалася майже вдвічі і наближалася до значень контролю. Отже, L-цистеїн виявляв більшу свою ефективність у пригніченні окисного стресу при старінні саме на ранніх етапах ПОЛ. Слід зауважити, що введення старим щурам L-цистеїну має ефекти подібні до протекторної дії такого потужного захисного механізму, як активація АТФ-чутливих калієвих каналів, зокрема, підвищення активності cNOS та, навпаки, пригнічення активності iNOS, нітратредуктази та аргінази [21]. І це не здається дивним з огляду на те, що сірководень може відкривати вищезгадані калієві канали із запуском відповідних протекторних механізмів [22].

Подібно до синтезу NO, в організмі ссавців, існують три шляхи синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  з L-цистеїну за допомогою трьох ізоферментів, які експресуються в тканинах серцево-судинної та нервової систем [8]. Імовірно, що збільшення внутрішньоклітинної концентрації амінокислоти L-цистеїну викликає додаткову активацію всіх трьох ферментів і, як наслідок, посилення синтезу  $\text{H}_2\text{S}$ . У попередніх працях нашого відділу було показано зміни синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  та NO на тлі підвищеного оксидативного і нітрозативного стресу у щурів за різних експериментальних моделях (старінні, гіпертензії, ішемії-реперфузії головного моз-

**Таблиця 2. Вміст маркерів різних шляхів генерації супероксидного радикала та продуктів перекисного окиснення ліпідів у мітохондріях серця старих щурів за дії L-цистеїну (121 мг/кг;  $M \pm m$ )**

Показник	Дорослі щури	Старі щури	Старі щури і дія L-цистеїну
Сечова кислота, нмоль/мг білка	$1,11 \pm 0,31$	$14,85 \pm 1,45^*$	$9,92 \pm 1,01^{*.*}$
Лейкотрієни $\text{C}_4$ , пмоль/мг білка	$0,44 \pm 0,06$	$2,53 \pm 0,28^*$	$2,38 \pm 0,33$
Тромбоксани $\text{B}_2$ , пмоль/мг білка	$0,92 \pm 0,15$	$1,57 \pm 0,19^*$	$1,41 \pm 0,42$
Дієнові кон'югати, нг/мг білка	$2,21 \pm 0,25$	$4,83 \pm 0,23^*$	$0,70 \pm 0,41^{*.*}$
Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка	$2,25 \pm 0,42$	$5,86 \pm 0,74^*$	$3,10 \pm 0,64$

ку тощо) в різних органах серцево-судинної системи, зокрема і в мітохондріях серця [7, 23, 24]. Виявилося, що як донор  $H_2S$  –  $NaHS$ , так і інгібітор різних шляхів його синтезу – пропаргілгліцин достовірно збільшували ендогенні пули  $H_2S$ , пригнічували як окисний так і нітрозативний стрес, відновлюючи синтез NO конститутивними NO-синтазами в аорті, серці та мітохондріях серця старих щурів [29].

Нині відомо, що сірководень здійснює свої сигнальні функції, зокрема в серцево-судинній системі, трьома різними механізмами: 1) відновлює та/або прямо зв'язується з центрами металопротейнового гему, 2) слугує потужним антиоксидантом через знешкодження АФК/АФА, 3) здійснює посттрансляційну модифікацію білків, приєднуючи тіолові (-SH) групи до реакційноздатних залишків цистеїну: процес, відомий як персульфідація [11]. Так, показано, що він проявляє антиоксидантні властивості, знижуючи вміст АФК, наприклад, у кардіоміоцитах під час ішемії-реперфузії, а також підвищує активність Mn- та Cu-залежної супероксиддисмутази (Mn-SOD та Cu-SOD) [26]. Вважається, що дія  $H_2S$  сприяє збереженню мітохондріальних функцій. Сірководень характеризується своїми антиапоптотичними властивостями, а саме запобігає апоптозу кардіоміоцитів, модулюючи експресію генів Bax і Bcl-2. З іншого боку, він здатен пригнічувати активацію каспази 3, а також підвищувати фосфорилування глікогенсинтазкінази-3- $\beta$ , що сприяє запобіганню відкривання МП. Протизапальна функція сірководню пов'язана з його властивістю знижувати вміст лейкоцитів та нейтрофілів у зоні ішемії, а також фактора некрозу пухлин  $\alpha$ , інтерлейкінів  $\beta$  і  $\delta$  та активність мієлопероксидази. Ця газова молекула також стимулює ангіогенез через АТФ-залежні калієві канали, активацію фосфатидилінозитол-3-кінази та протеїнкінази B. Безсумнівно, що газові медіатори взаємодіють, модулюючи ефекти один одного. Показано, що сірководень попереджує ішемічно-реперфузійні ушкодження серця,

підвищуючи продукцію NO через активацію ендотеліальної NO-синтази. Натомість NO та пероксинітрит реагують з сірководнем, формуючи при цьому нітрозотіоли, які також мають регуляторні функції [27].

Таким чином, проведені дослідження свідчать, що за умов одноразового введення старим щурам попередника синтезу  $H_2S$  L-цистеїну в мітохондріях серця відновлювалися пули  $H_2S$ , що сприяло зниженню надпродукції NO внаслідок інгібування індукцйбельного і реутилізаційного його синтезу, а також неокисному метаболізму L-аргініну на тлі ефективного інгібування розвитку оксидативного стресу, які неодмінно супроводжують процес старіння організму. Це сприяло модуляції змін проникності мітохондріальних мембран, а саме пригніченню МП у серці при старінні, що може бути важливим регуляторним фактором у попередженні серцево-судинних захворювань.

## ВИСНОВКИ

1. Показано, що одноразове введення старим щурам L-цистеїну (121 мг/кг) пригнічувало спонтанне і  $Ca^{+2}$ -індуковане набухання мітохондрій, що проявлялось зниженням амплітуди цих процесів і свідчило про запобігання пороутворенню у серці.

2. У мітохондріях серця старих щурів знижувались ендогенні пули сірководню на тлі порушення конститутивного синтезу NO, суттєвого підвищення індукцйбельного та реутилізаційного синтезу NO, а також активації мітохондріальної аргінази.

3. Протекторна дія L-цистеїну у старих тварин характеризувалася відновленням мітохондріальних пулів  $H_2S$ , що сприяло пригніченню надпродукції NO, реутилізаційного синтезу NO та неокисного шляху метаболізму L-аргініну.

4. На тлі зниження мітохондріальних пулів  $H_2S$  у серці при старінні розвивався оксидативний стрес, на що вказує зростання вмісту сечової кислоти,  $LTc_4$  та  $TxB_2$ , а також маркерів процесу ПОЛ – ДК і МДА.

5. За умов введення L-цистеїну старим тва-



ринам ефективно знижувалися пули сечової кислоти, що свідчить про пригнічення утворення  $\text{O}_2^-$ , а також достовірно зменшувалися пули ДК.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**Н.А. Струтинская, Ю.П. Коркач, Л.А. Мись, А.Ю. Лучковая, В.Ф. Сагач**

### **L-ЦИСТЕИН СТИМУЛИРУЕТ ЭНДОГЕННЫЙ СИНТЕЗ СЕРОВОДОРОДА, ПОДАВЛЯЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ОТКРЫВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ В СЕРДЦЕ СТАРЫХ КРЫС**

Исследовали влияние аминокислоты L-цистеина на содержание сероводорода, показатели окислительного стресса и кинетические характеристики  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного набухания митохондрий в сердце старых крыс. Показано, что однократное введение L-цистеина (121 мг/кг) подавляло спонтанное и  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированное набухание митохондрий, проявляющееся в снижении амплитуды этих процессов и свидетельствующее о предотвращении порообразования в сердце. При старении снижались митохондриальные пулы сероводорода на фоне нарушения конститутивного синтеза NO, существенного повышения индуцибельного, а также реутилизационного синтеза NO. Применение L-цистеина приводило к увеличению в 2,56 раза содержания сероводорода в митохондриях сердца старых животных ( $6,015 \pm 0,74$  нмоль/мг белка) по сравнению с таковыми без введения аминокислоты ( $2,35 \pm 0,25$  нмоль/мг белка). Итак, в этих условиях восстанавливался синтез сероводорода в митохондриях, вероятно, вследствие активации  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезирующих ферментов их субстратом, способствовало достоверному угнетению индуцибельного синтеза NO в 1,73 раза и снижению вдвое активности нитратредуктазы и аргиназы. В условиях введения L-цистеина старым животным достоверно (в 1,5 раза) снижались пулы мочевой кислоты, тем самым подавляя образование супероксидного радикала, а также существенно уменьшались пулы диеновых конъюгатов (в 7 раз), что указывает на угнетение окислительного стресса при старении именно на ранних этапах перекисного окисления липидов. Таким образом, результаты исследований свидетельствуют об участии L-цистеина в стимуляции эндогенного синтеза сероводорода в митохондриях, что способствует снижению оксидативного стресса в органеллах и модуляции изменений проницаемости митохондриальных мембран. Этот факт говорит о важности газового транмиттера сероводорода как регуляторного фактора в сердечно-сосудистой системе,

который осуществляет модуляторный контроль функций клеток и их органелл.

Ключевые слова: L-цистеин; сероводород; окислительный стресс; неспецифическая митохондриальная пора; старение.

**N.A. Strutynska, Yu.P. Korkach, L.A. Mys, A.Yu. Luchkova, V.F. Sagach**

### **L-CYSTEINE STIMULATES ENDOGENOUS HYDROGEN SULFIDE SYNTHESIS, SUPPRESSES OXIDATIVE STRESS AND MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING IN THE HEART OF OLD RATS**

The effect of the amino acid L-cysteine on the hydrogen sulfide content, oxidative stress indicators and kinetic characteristics of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial swelling in the heart of aged rats were investigated. Single administration to old rats of L-cysteine (121 mg/kg) was shown to suppress spontaneous and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced swelling of mitochondria, which manifested in a decrease in the amplitude of these processes and indicated prevention of mPTP formation in the heart. During aging, the mitochondrial pools of hydrogen sulfide decreased against the background of violation of constitutive NO synthesis, and also a significant increase of inducible and salvage NO synthesis. The use of L-cysteine resulted in an increase of 2.56-fold the content of hydrogen sulfide in the mitochondria of the heart of old rats ( $6.015 \pm 0.74$  nmol/mg protein) compared to animals without the introduction of the amino acid ( $2.35 \pm 0.25$  nmol/mg protein). Hence, under these conditions, the synthesis of hydrogen sulfide in the mitochondria was restored, probably due to the activation of  $\text{H}_2\text{S}$ -synthesizing enzymes by their substrate, which contributed to significant inhibition of inducible NO synthesis by 1.73 times and a decrease by 2 times of nitrate reductase and arginase activity. The introduction of L-cysteine to old animals significantly (1.5 times) reduced uric acid pools, which may indicate suppression of superoxide radicals formation, and significantly decreased pools of diene conjugates (7 times), which indicates the suppression of oxidative stress in the early stages of lipid peroxidation. Thus, the results of studies indicate the participation of L-cysteine in the stimulation of endogenous hydrogen sulphide synthesis in mitochondria, which contributes to the reduction of oxidative stress in organelles and modulation of changes in the permeability of mitochondrial membranes. This fact speaks to the importance of such a gas transmitter as hydrogen sulphide, as a regulatory factor in the cardiovascular system, which modulates the functions of cells and their organelles.

Key words: L-cysteine; hydrogen sulphide; oxidative stress; nonspecific mitochondrial pore; aging.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: na-strutynska@biph.kiev.ua*

## REFERENCES

1. Yin J, Ren W, Yang G, et al. L-Cysteine metabolism and its nutritional implications. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60:134-46.
2. Bełtowski J. Synthesis, metabolism, and signaling mechanisms of hydrogen sulfide: An overview. *Methods Mol Biol*. 2019;2007:1-8.
3. Chadwick RP, Kearsley MD, and Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors: chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem Pharmacol*. 2018 Mar;149:110-23.
4. Sahach VF, Shymans'ka TV, Hoshovs'ka IuV. Effects of stimulation and blockade of the synthesis of endogenous hydrogen sulfide at myocardial ischemia-reperfusion. *Fiziol Zh*. 2013;59(4):8-15. [Ukrainian].
5. Semenykhina OM, Baziliuk OV, Korkach IuP, Sahach VF. The effect of hydrogen sulfide on contractile activity of the vascular smooth muscles in rats. *Fiziol Zh*. 2011;57(4):3-11. [Ukrainian].
6. Strutynska NA, Semenykhina OM, Chorna SV, Vavilova GL, Sagach VF. Hydrogen sulfide inhibits Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart. *Fiziol Zh*. 2011;57(6):3-13. [Ukrainian].
7. Strutynska 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].
8. Murphy B, Bhattacharya R, Mukherjee P. Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease. *FASEB J*. 2019;33:13098-125.
9. Rajendran S, Shen X, Glawe J, Kolluru GK, Kevil CG. Nitric oxide and hydrogen sulfide regulation of ischemic vascular growth and remodeling. *Compr Physiol*. 2019 Jun 12;9(3):1213-47.
10. Drachuk KO, Kotsiuruba AV, Sagach VF. Hydrogen sulfide donor, NaHS, recovers constitutive NO synthesis and endothelium-dependent relaxation of isolated aorta in old rats. *Fiziol Zh*. 2015;61(6):3-10. [Ukrainian].
11. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2'-dipyridyl disulfide. *Anal Biochem*. 1980;107(1):51-5.
12. Boyde JR, Rahmotullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal Biochem*. 1980;107(2):424-31.
13. Alikulov ZA, L'vov NP, Kretovich VL. Nitrate and nitrite reductase activity of milk xanthine oxidase. *Biokhim*. 1980;45(9):1714-8.
14. Zhang C, Hein TW, Wang W, Chang CI, Kuo L. Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. *FASEB J*. 2001;15(7):1264-6.
15. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126(1):131-8.
16. Pfeiffer S, Gorren AC, Schmidt K, Werner ER, Hansert B, Bohle DS, Mayer B. Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J Biol Chem*. 1997;272:3465-70.
17. Gavrilov VB, Gavrilova AR, Khmara NF. Measurement of diene conjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts. *Lab Delo*. 1988;2:60-4.
18. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978;86(1):271-8.
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
20. Varanyuwatana P and Halestrap AP. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion*. 2012 Jan;12(1):120-5.
21. Strutyns'kyi RB, Kotsiuruba AV, Neshcheret OP, Rovents' RA, Moibenko OO. The changes of metabolism in myocardium at ischemia-reperfusion and activating of the ATP-sensitive potassium channels. *Fiziol Zh*. 2012;58(1):13-26. [Urainian].
22. Tabassum R, Jeong NY. Potential for therapeutic use of hydrogen sulfide in oxidative stress-induced neurodegenerative diseases. *Int J Med Sci*. 2019 Sep 20;16(10):1386-96.
23. Kotsuruba AV, Dorofeyeva NA, Sagach VF. NOS uncoupling is accompanied with induction of the oxidative stress and the cardiohemodynamics disturbances in hypertension. *Fiziol Zh*. 2015;61(3):3-10. [Urainian].
24. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. 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. [Urainian].
25. Drachuk KO, Dorofeyeva NA, Kotsiuruba AV, Sagach VF. Effect of propargylglycine upon cardiohemodynamics in old rats. *Fiziol Zh*. 2015;61(4):35-40. [Urainian].
26. Sun W-H, Liu F, Chen Y, and Zhu Y-C. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion. *Biochem Biophys Res Comm*. 2012;421(2):164-9.
27. King AL, Polhemus DJ, Bhushan S. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthasenic oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(8):3182-7.

*Матеріал надійшов до редакції 16.01.2020*