

Т.В. Шиманська, Ю.В. Гошовська, О. М. Семеніхіна, В.Ф. Сагач

Вплив сірководню на реакції ізольованого серця щурів при навантаженні об'ємом і ішемії–реперфузії

В експериментах на перфузованих за методом Лангендорфа серцях щурів вивчали ефекти донора сірководню гідросульфиду натрію (NaHS) на зміни функціонального стану, резервні можливості серця та його реакцію на ішемію–реперфузію (20хв/40хв). Ступінь порушення проникності мітохондріальних мембран – утворення мітохондріальних пор – оцінювали за вивільненням в коронарне русло мітохондріального фактора ($\lambda=250$ нм). У тих самих умовах за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції визначали рівень експресії гена UCP3. У суспензії мітохондрій серця вимірювали мембранний потенціал. Показано, що внутрішньоочеревинне введення щурам NaHS ("Sigma", США) у дозі 7,4 мг/кг супроводжувалося збільшенням функціональних резервів серця. Кут підйому кривої кінцево-діастолічного тиску у них був меншим, а плато кривої Франка–Старлінга – тривалішим. NaHS збільшував мембранний потенціал мітохондрій серця, але не впливав на експресію гена UCP3. Ступінь відновлення показників кардіодинаміки після 20-хвилинної ішемії на тлі застосування NaHS був істотно вищим, ніж у контрольній серії внаслідок зменшення утворення мітохондріальних пор. Зроблено висновок, що донор сірководню у досліджуваній дозі має кардіопротекторний ефект.

Ключові слова: сірководень, ізольоване серце, крива Франка–Старлінга, ішемія–реперфузія, мітохондріальна пора, роз'єднувальні білки, мембранний потенціал мітохондрій.

ВСТУП

З моменту відкриття ендogenous синтезу сірководню (H_2S) інтерес до вивчення його ролі як можливого газового посередника постійно зростає. В організмі H_2S синтезується з L-цистеїну за допомогою ферментів цистатіонін- β -синтази (ЦБС) і цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ). У серці [18] та стінках кровоносних судин [21, 28] переважає ЦГЛ. Крім того, в серці H_2S утворюється ферментом 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою, який проявляє активність як у цитозолі, так і в мітохондріях [20]. Встановлено, що він контролює широкий спектр функцій серцево-судинної системи: зміни тонуусу гладеньких м'язів [16], ангиогенез, ефекти запалення та шоку, опосередковує цитопротекцію на моделях ішемічно-реперфузійного пошкодження міокарда [19, 30]. До молекулярних механізмів дії H_2S відносять регулювання

деяких сигнальних білків, його взаємодію з оксидом азоту (NO) [29] і регуляцію відкривання АТФ-залежних калієвих (K^+ АТФ) каналів [6, 24]. Ми припустили, що регуляторна дія сірководню може реалізовуватися через зміну проникності мітохондріальних мембран і, відповідно, енергопродукувальної функції мітохондрій [15].

Метою нашої роботи було з'ясування впливу донора сірководню гідросульфиду натрію (NaHS) на функціональний стан і механізми попередження реперфузійних порушень функції серця.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили згідно з вимогами Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986).

Кардіодинаміка ізольованого серця. На ізольованих серцях щурів лінії Вістар ма-

сою 350–400 г здійснювали ретроградну перфузію коронарних судин при постійному тиску 75 мм рт. ст., температурі 37°C, аерації карбогеном (95 % O₂ і 5 % CO₂) розчином Кребса–Хензелейта складу (ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 24; KH₂PO₄ – 1,2; глюкоза – 10; CaCl₂ – 2,5. Тиск, що розвивається в порожнині лівого шлуночка (ТЛШ), його першу похідну dP/dt_{\max} і dP/dt_{\min} , кінцево-діастолічний тиск (КДТ) вимірювали за допомогою латексного балончика тензодатчиком 746 («Мінгограф-82», «Елема», Швеція) та реєстрували цифровий сигнал за допомогою програмного забезпечення Global Lab 2.0. Коронарний потік визначали як об'єм розчину, що відтікав від серця за 1 хв. Розраховували інтенсивність скоротливої функції (ІСФ) як добуток тиску, що розвивається в лівому шлуночку, і частоти серцевих скорочень (ЧСС). Для розрахунку споживання кисню міокардом електродом Кларка вимірювали напруження кисню у пробах розчину, що притікав і відтікав від серця, за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk 2 (Данія). Кисневу вартість роботи серця розраховували як співвідношення споживання кисню до ІСФ. Для оцінки функціональних резервів міокарда проводили дозоване навантаження серця об'ємом: балончик у лівому шлуночку розтягували з кроком 34 мкл і будували криву Франка–Старлінга залежності змін КДТ і ТЛШ від об'єму.

Ішемію–реперфузію серця моделювали за допомогою повного припинення перфузії коронарних судин протягом 20 хв. Під час ішемії серця занурювали у перфузійний розчин (37°C). Зміни досліджуваних показників реєстрували протягом 40 хв після відновлення перфузії коронарних судин.

За допомогою спектрофотометра ($\lambda = 230 - 260$ нм) реєстрували оптичну густину розчину, що відтікав від серця до ішемії і за 1-шу хвилину реперфузії. Це дія виявлення мітохондріального фактора, який зумовлює характерний пік екстинції при довжині хвилі 245–250 нм, і може бути маркером відкри-

вання мітохондріальних пор в умовах *in situ* та *in vivo* [3].

Для з'ясування впливу екзогенного сірководню на функціональний стан, резервні можливості і реперфузійні порушення функції серця за 30 хв до початку експерименту внутрішньоочередивно вводили донор сірководню NaHS («Sigma», США) з розрахунку 7,4 мг/кг, який розчиняли в 0,5 мл фізіологічного розчину.

Мітохондрії з тканин серця виділяли методом диференційного ультрацентрифугування. Серця ретельно промивали охолодженим розчином 0,9%-го KCl (2–4°C), подрібнювали та гомогенізували у 10-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). Супернатант центрифугували повторно при 7000 g 16 хв (4°C). Отриманий осад (мітохондріальна фракція) суспендували в буфері (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НCl – 25, рН 7,2–7,4, і одразу використовували в дослідах. Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі.

Мембранний потенціал мітохондрій серця оцінювали методом, запропонованим Брандом [8, 22]. Мітохондрії інкубували в середовищі, що містило (ммоль/л): KCl – 120, тріс-НCl – 25, KH₂PO₄ – 3, 5% знежиреного бичачого сироваткового амбуліну, рН 7,2–7,4. У герметичну термостатовану камеру (37°C), обладнану ТРМР⁺-селективним електродом (від англ. triphenylmethylphosphonium sensitive electrode) і електродом Кларка, вносили мітохондрії з розрахунку 0,5 мг/мл білка. Роботу першого комплексу дихального ланцюга блокували ротеноном ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/л), а роботу АТФ-синтази – олігоміцином (10^{-7} моль/л). Для ініціації дихання вносили сукцинат натрію (5 ммоль/л). Поглинання кисню суспензією мітохондрій реєстрували за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk 2 (Данія), а зміни концентрації ТРМР⁺ – рН-метра PP-25 Sartorius (Німеччина). Мембранний потенціал мітохондрій ($\Delta\psi_m$) розраховували

за рівнянням Нернста, приймаючи значення внутрішнього об'єму мітохондрій за 0,65 мкл/мг білка [7].

Експресію гена UCP3 вивчали в зразках тканин серця у контрольних і тварин після введення NaHS. Контрольні серця перфузували протягом години без жодних впливів. Верхівку серця щурів відрізали і виділяли РНК за допомогою реактивів TRIZOL (“Sigma”, США). Для зворотної транскрипції застосовували RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва), використовуючи 300–600 нг тотальної РНК і випадковий гексамерний праймер (від англ. random hexamer primer). Отриману одноланцюгову ДНК використовували для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для ампліфікації фрагментів генів UCP3 і актину (внутрішній контроль). Послідовність нуклеотидів у праймерах: прямий – 5'-GTG ACC TAT GAC ATC ATC AAG GA-3', зворотний – 5'-GCT CCA AAG GCA GAG ACA AAG-3' для гена UCP3; прямий – 5'-TCA TCA CTA TCG GCA ATG-3', зворотний – 5'-GGC CAG GAT AGA GCC ACC A-3' для гена актину. Суміш для ампліфікації містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 30 пмоль/л кожного з праймерів (“Metabion”, Німеччина), 0,5 ОД Таq-полімерази (“Ампі-Сенс”, Росія) і ДНК-матрицю, отриману в результаті зворотної транскрипції. Об'єм проби доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmp System 2700 (“Applied Biosystems”, США). Ампліфікація фрагментів указаних генів складалася з 33 циклів для гена UCP3 і 28 для актину. Кожен з циклів включав: денатурацію – 94°C (30 с), гібридизацію праймерів – 58°C (60 с) і елонгацію – 72°C (60 с). Візуалізацію й оцінку яскравості ампліфікатів після горизонтального електрофорезу (145 В протягом 25 хв) в 1,5%-му агарозному гелі з бромідом етидію, проводили за допомогою транслюмінатора і програмного забезпечення ViTran (“Биоком”, Росія). Розраховували відношення

інтенсивності світіння одержаних ампліфікатів UCP3 до актину та подавали у вигляді графіків.

Статистичну обробку результатів здійснювали за програмою Origin 6.1 і виражали у вигляді середнього \pm стандартне відхилення. Достовірність змін показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив NaHS на функціональний стан і кисневі показники роботи серця щурів. Для з'ясування впливу сірководню екзогенного походження на функціональний стан серця ми обрали NaHS, який у розчині дисоціює на іони Na^+ і HS^- , останній взаємодіє з протоном і утворює H_2S . Попереднє внутрішньоочеревинне введення NaHS зменшувало швидкість розслаблення міокарда, ЧСС і інтенсивність скоротливої функції серця (таблиця). Тенденція до збільшення коронарного потоку вказувала на вазорелаксуючу дію NaHS. Його застосування достовірно не змінювало споживання кисню міокардом, однак стійка тенденція до збільшення кисневої вартості роботи серця, що становила $25,3\% \pm 11,6\%$, опосередковано могла свідчити про пригнічення екзогенним сірководнем активності цитохромоксидази *c*.

Зменшення роботи серця було зумовлено насамперед уповільненням ЧСС. Є повідомлення, що у концентраціях, які перевищують 50 мкмоль/л, H_2S виражено впливає на електричну активність правого передсерця щурів [30], викликає істотні зміни конфігурації потенціалу дії у волокнах робочого міокарда і сповільнення синусного ритму, а у концентраціях понад 100 мкмоль/л – пригнічує електричну активність [1]. Ми дійшли висновку, що за зменшенням ЧСС можна судити про потужність дії сірководню на міокард. Схоже, що в організмі існує тонка межа між захисною і токсичною дозами H_2S : істотне зменшення ЧСС, на наш погляд, може бути прогностичною ознакою токсичного впливу H_2S .

Вплив внутрішньоочеревого введення NaHS (7,4 мг/кг) на показники функціонального стану серця щурів (M ± m, n=8)

Показники функціонального стану серця	Контроль	NaHS
Тиск, що розвивається у лівому шлуночку, мм рт.ст.	114±1,6	115±5,2
Швидкість скорочення міокарда, dP/dt_{max} , мм рт. ст./с	2072±42	2011±130
Швидкість розслаблення міокарда, dP/dt_{min} , мм рт. ст./с	-2129±52	-1543±166**
Коронарний потік, мл/хв	14,9±1,4	16,5±1,0
Частота серцевих скорочень, $хв^{-1}$	227±4,1	176±14,7**
Інтенсивність скоротливої функції, мм рт. ст. · $хв^{-1}$	24796±333	20074±2109*

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Для виявлення функціональних резервів у сердець після впливу екзогенного сірководню проводили тест навантаження об'ємом. Установлено, що серця щурів, яким вводили NaHS, краще витримували додаткове навантаження порівняно з контрольними тваринами. Вони відповідали більш потужною силою скорочення, що відображувалося у підвищенні тиску при розтягуванні лівого шлуночка. Плато кривої Франка–Старлінга у них було тривалішим, а кут підйому кривої КДТ менш крутим (рис. 1). Останнє свідчило про зменшення діастолічної жорсткості міокарда. Отже, застосування NaHS у досліджуваних дозах супроводжувалося збільшенням

функціональних резервів серця.

Вплив NaHS на розвиток реперфузійних порушень функції серця. Зіставлення показників скоротливої активності, кисневого забезпечення діяльності серця і ступеня порушення проникності мітохондріальних мембран, який визначався опосередковано за вивільненням мітохондріального фактора, показало, що застосування NaHS запобігало розвитку істотних реперфузійних порушень функції серця (рис. 2). Ступінь відновлення показників кардіодинаміки після 20-хвилинної ішемії був достовірно вищим, ніж у контрольній серії. До 40 хв спостереження швидкість скорочення міокарда практично

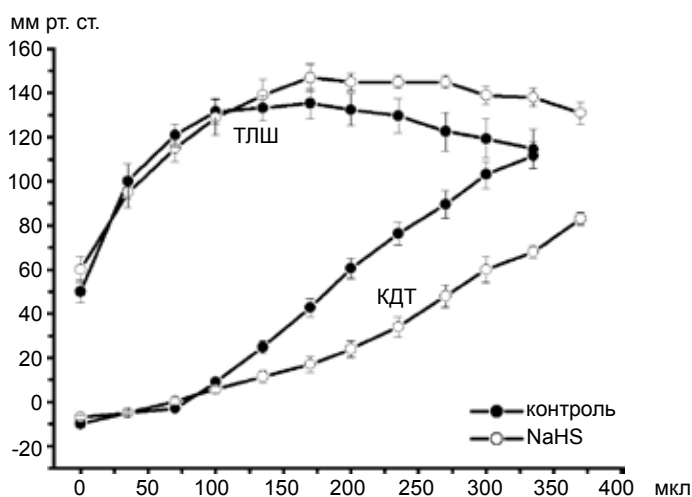


Рис. 1. Вплив NaHS на зміни тиску у лівому шлуночку (ТЛШ) і кінцево-діастолічний тиск (КДТ) ізольованого серця при навантаженні об'ємом (крива Франка–Старлінга)

збігалася з її значенням до ішемії, а швидкість розслаблення навіть перевищувала таку. Аналогічним чином змінювався показник роботи серця – ІСФ. Динаміка ЧСС у контрольній і дослідній серіях була протилежною: застосування NaHS уповільнювало її до $138 \text{ хв}^{-1} \pm 24 \text{ хв}^{-1}$, однак при реперфузії вона поступово підвищувалася до $209 \text{ хв}^{-1} \pm 19 \text{ хв}^{-1}$, в контрольних експериментах ЧСС до ішемії становила $212 \text{ хв}^{-1} \pm 12 \text{ хв}^{-1}$, а до кінця реперфузії знижувалася до $154 \text{ хв}^{-1} \pm 20 \text{ хв}^{-1}$. Коронарний потік відновлювався майже на 3/4 від його доішемічного рівня, а в контрольних експериментах – лише наполовину. Отже, введення донора сірководню за 30 хв до початку експерименту запускало кардіопротекторні механізми, в результаті дії

яких міокард краще справлявся з ішемією–реперфузією.

Спектрофотометричні вимірювання показали слідові кількості мітохондріального фактора у розчині, що вивільнювався з початком реперфузії із серця щурів, яким вводили NaHS (рис. 3). Оптична густина розчину при $\lambda = 250 \text{ нм}$ збільшувалася лише на $0,013 \text{ ум.од.} \pm 0,003 \text{ ум.од.}$ порівняно з $0,079 \text{ ум.од.} \pm 0,003 \text{ ум.од.}$ у контрольних тварин ($P < 0,001$). Останнє свідчило, що донор сірководню сприяв запобіганню утворенню мітохондріальних пор. Результати наших експериментів підтверджуються даними, що отримані на суспензії мітохондрій, згідно з якими NaHS зменшував чутливість мітохондріальних мембран до індуктора відкриття

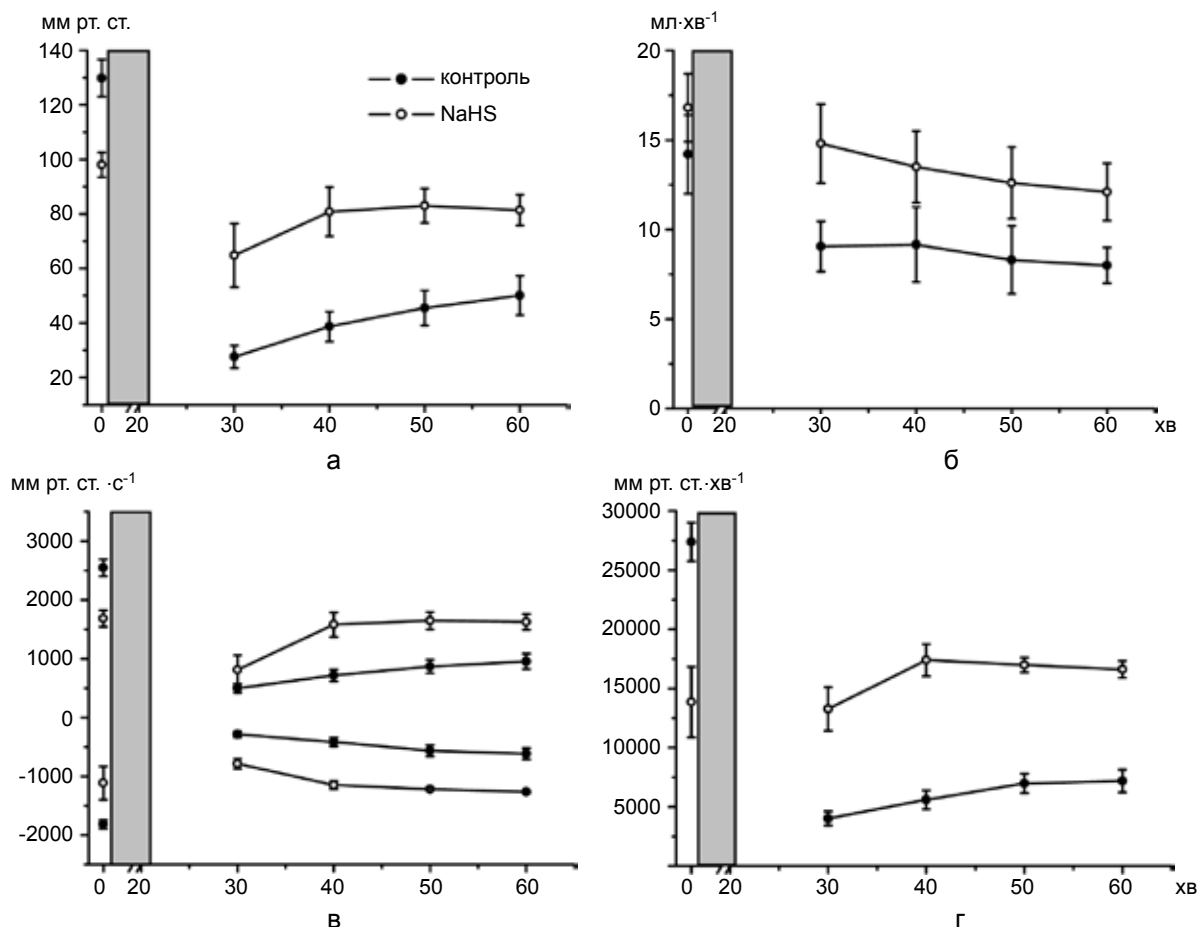


Рис. 2. Вплив NaHS на показники кардіодинаміки при реперфузії ішемізованого серця: а – тиск, що розвивається у лівому шлуночку, б – коронарний потік, в – швидкість скорочення та розслаблення міокарда, г – інтенсивність скоротливої функції серця

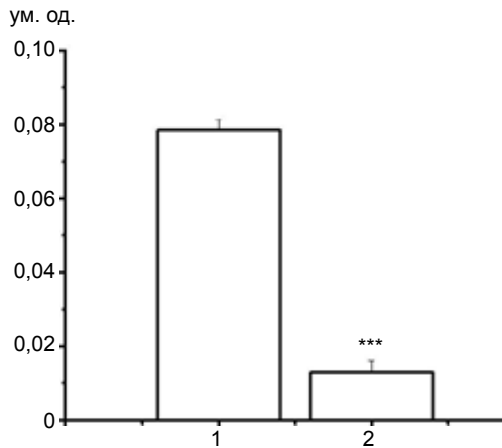


Рис. 3. Оптична густина розчинів, що відтікали від серця за першу хвилину реперфузії в контролі (1) і за попереднього впливу NaHS (2). *** P<0,001

мітохондріальних пор – Ca²⁺ – і запобігав порозалежному набухання мітохондрій [4].

Експресія гена UCP3 під впливом NaHS. Ми припустили, що механізм захисної дії NaHS може реалізуватися за принципом фармакологічного прекодиціювання. В такому разі існує ймовірність участі роз'єднувальних білків у формуванні захисного механізму NaHS за аналогією з їх дією при ішемічному прекодиціюванні, що було продемонстровано нами раніше [2]. За допомогою ПЛР було встановлено, що попереднє введення тваринам донора H₂S не впливало на зміну рівня експресії гена UCP3 (рис. 4). Це свідчило, що за нормальних умов NaHS не збільшує протонну провідність мітохондріальних мембран, що опосередковується активністю UCP3. З літератури відомо, що

NaHS запобігає цитотоксичності та розвитку хвороби Паркінсона у мишей, викликаній 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридином, а дефіцит UCP2 у дофамінергічних нейронах усуває нейропротекторну дію NaHS [32]. Однак участь роз'єднувальних білків в опосередкуванні кардіопротекторної дії донора сірководню залишається нез'ясованою і потребує подальших досліджень.

Вимірювання мембранного потенціалу у суспензії мітохондрій серця щурів. Після введення NaHS Δψ_m в умовах максимальної швидкості поглинання кисню збільшувався та становив 150,3 мВ ± 6,3 мВ порівняно з 136,5 мВ ± 10,7 мВ у мітохондріях серця контрольних тварин (P<0,05), що свідчило про більш ефективну роботу дихального ланцюга мітохондрій за цих умов.

NaHS може діяти як SH-агент і зв'язуватися з –SH-групами білків, зокрема структурних компонентів мітохондріальних пор. Саме цим пояснюють зменшення чутливості мітохондрій до іонів кальцію та їх набухання [4]. У разі блокади мітохондріальних пор, які є регуляторами кальцієвого гомеостазу [12], в матриці мітохондрій накопичується кальцій, який стимулює роботу дегідрогеназ дихального ланцюга. Це призводить до збільшення протонного градієнта і, відповідно, до збільшення Δψ_m.

Отримані нами результати цікаві та викликають багато питань. На відміну від перфузії серця донором при внутрішньоочеревинному його введенні ми виявили кардіопротекторний ефект екзогенного сірководню. Залиша-

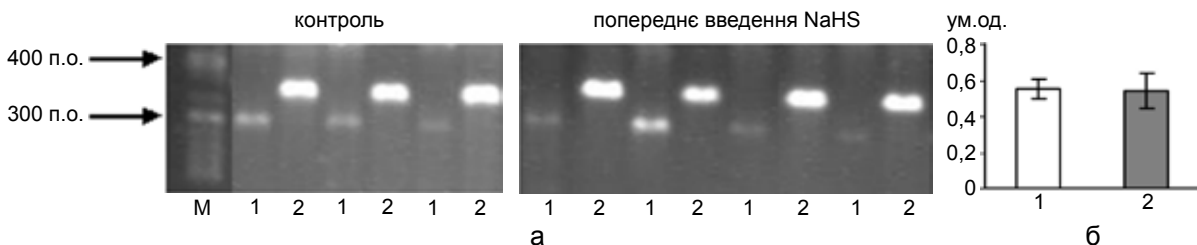


Рис. 4. Вплив внутрішньоочеревинного введення NaHS на експресію гена UCP3 у серці щурів: а – результати електрофорезу ампліфікованих фрагментів генів актину (1) і UCP3 (2), М – маркер молекулярної маси; б – відносний рівень експресії гена UCP3 до актину в контролі (1, n=3) і з попереднім введенням NaHS (2, n=4), п.о. – пара основ

ється незрозумілим, що саме визначає межу між захисною і токсичною його дозою.

Виникає питання про мішені та шляхи відтворення кардіопротекторного впливу сірководню. Нині встановлено, що сірководень, який продукується ендогенно та потрапляє в судинне русло, може бути вагомим фізіологічним регулятором тонуусу гладеньких м'язів судин [10]. Порушення його синтезу виявлено при гіпертензії, що вказує на істотний вплив цього газового трансмітера на регуляцію функції серця і розвиток патологічних станів серцево-судинної системи [27]. В наших експериментах спостерігалася стійка тенденція до підвищення коронарного потоку після застосування NaHS. Є свідчення, що розслаблювальний вплив NaHS на гладенькі м'язи аорти [5] і коронарних артерій [10] опосередковують K^+_{ATP} -канали [31]. Встановлено, що інгібітори ЦГЛ знижують K^+_{ATP} -залежний струм, що говорить про постійну стимуляцію ендогенним H_2S K^+_{ATP} -каналів у фізіологічних умовах [6]. Існує думка, що сірководень діє через мітохондріальні K^+_{ATP} -канали як м'який роз'єднувач [25].

Відомості про роль різних типів K^+_{ATP} -каналів у реалізації кардіопротекторного ефекту сірководню досить суперечливі. Віан і співавт. [6] виявили, що блокування K^+_{ATP} -каналів сарколеми знімало ефект введення сірководню, а внутрішньовенне застосування специфічного блокатора мітохондріальних K^+_{ATP} -каналів 5-гідроксидеканоату (5-HD) не впливало на розмір інфаркту ішемізованого серця. Sivarajah і співавт. [24] дійшли висновку, що H_2S не мав захисного впливу на міокард при внутрішньовенному застосуванні 5-HD. Згідно з даними Струтинської та співавт. [4], преінкубація ізольованих мітохондрій серця з 5-HD викликала ослаблення протекторного ефекту донора сірководню відносно кальційіндукованого відкриття мітохондріальних пор. Це може свідчити про участь мітохондріальних K^+_{ATP} -каналів у H_2S -залежному інгібуванні пороутворення в серці, що спостерігається при його реперфузії.

Встановлено, що активація екзогенним сірководнем протеїнкінази с клітини призводить до хелатування іонів кальцію і зменшення пошкоджень кардіоміоцитів при реперфузії [23]. Експериментально, з використанням культури міоцитів, було доведено, що сірководень стимулює фосфорилування ERK1/2 (від англ. extracellular signal regulated kinase) і Akt (протеїнкіназа B), що в свою чергу знижує ризик розвитку апоптозу [10]. Отже, K^+_{ATP} /PKC/ERK1/2 і PI3K (від англ. phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt – шляхи реалізації кардіопротективної дії сірководню. Основною мішенню вищезазначеного механізму каскадів є біла транзиторної проникності в мембранах мітохондрій [11, 13]. H_2S здатен активувати Akt – головну кіназу RISK-шляху (від англ. reperfusion injury salvage kinase-pathway) [14], що фосфорилує ендотеліальну NO-синтазу. Її активація блокує відкривання мітохондріальних пор транзиторної проникності, що ми могли спостерігати в наших дослідах за істотним зменшенням вивільнення мітохондріального фактора. Зважаючи на це, цілком зрозуміло, що введення шурам NaHS не впливало і на експресію роз'єднувальних білків, каналів у внутрішній мембрані мітохондрій, що опосередковують протонний витік з міжмембранного простору мітохондрій.

Цілісність мембран мітохондрій забезпечується також ефективною роботою системи антиоксидантного захисту – ферментами супероксиддисмутазою, каталазою і глутатіоном. Повідомляється, що H_2S знижував концентрацію малонового діальдегіду та підвищував активність супероксиддисмутази в серцях шурів за умов травматичного геморагічного шоку [9]. Вживання кардіоміоцитів після ішемії збільшувалось за наявності екзогенного сірководню внаслідок підвищення активності супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази [26]. Встановлено, що H_2S зв'язується з активним центром Cu-Zn-залежної супероксиддисмутази і є алостеричним регулятором, стимулюючи активність

ензиму. Збільшення функціональних резервів серця щурів експериментальної групи може бути результатом активації антиоксидантних систем.

У наших дослідженнях було зареєстровано зменшення швидкості розслаблення міокарда під впливом NaHS. Можна припустити, що екзогенне введення безпосередньо впливає на скоротливий апарат кардіоміоцитів, модифікуючи білки внаслідок відновлення дисульфідних зв'язків (S=S) або приєднання атома сірки до тіолової групи (-SH) з утворенням гідроперсульфідного залишку (-SSH) [17]. Відомо, що обидві модифікації змінюють конформацію і функціональної активності білків, серед яких могли опинитися молекули актин-міозинового комплексу, іонні канали, мембранні та цитозольні білки, що синтезують вторинні посередники тощо. Однак виявлені нами потужні функціональні резерви серця свідчать про позитивний вплив сірководню на гладенькі м'язи судин.

Слід зазначити, що захисний ефект NaHS у нашій моделі мав тимчасовий характер. Його тривалість не перевищувала 60 хв після початку експерименту. Кардіопротекторний вплив NaHS практично нівелювався вже через 2 год – реакція серця на ішемію–реперфузію в цей період повністю збігалася з такою в контрольній групі. Стабілізуючий вплив NaHS на мітохондріальні мембрани кардіоміоцитів підтверджувався високим рівнем мембранного потенціалу мітохондрій і зниженням вивільнення мітохондріального фактора при реперфузії міокарда. Подальші дослідження ефектів ендогенного й екзогенного сірководню матимуть змогу визначити основні мішені його впливу.

ВИСНОВКИ:

1. Застосування NaHS супроводжувалося збільшенням функціональних резервів міокарда. При розтягуванні лівого шлуночка серця щурів, яким вводили гідросульфід натрію, відповідали більш потужною силою

скорочення. Кут підйому кінцево-діастолічного тиску у них був меншим, а плато кривої Франка–Старлінга – тривалішим, що свідчило про зменшення діастолічної жорсткості міокарда.

2. Введення NaHS попереджало розвиток реперфузійних порушень функції серця, оскільки відновлення показників кардіодинаміки після ішемії при внутрішньоочеревинному його введенні було істотно вищим, ніж у контролі. NaHS запобігав надмірному утворенню мітохондріальних пор під час ішемії–реперфузії. Попереднє введення NaHS не впливало на рівень експресії гена UCP3, але збільшувало мембранний потенціал мітохондрій серця.

**Т.В. Шиманская, Ю.В. Гошовская,
О. М. Семенихина, В.Ф. Сагач**

ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА РЕАКЦИЮ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫС ПРИ НАГРУЗКЕ ОБЪЕМОМ И ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ

В экспериментах на изолированных сердцах крыс, перфузируемых по методу Лангендорфа, изучали эффекты донора сероводорода гидросульфида натрия (NaHS) на изменения функционального состояния, резервные возможности сердца и его реакцию на ишемию–реперфузию (20хв/40хв). Степень нарушения проницаемости митохондриальных мембран – образование митохондриальных пор – оценивали по высвобождению в коронарное русло митохондриального фактора ($\lambda = 250$ нм). В тех же условиях с помощью метода полимеразной цепной реакции определяли уровень экспрессии гена UCP3. В суспензии митохондрий сердца измеряли мембранный потенциал. Показано, что внутрибрюшинное введение крысам NaHS ("Sigma", США) в дозе 7,4 мг/кг сопровождалось повышением функциональных резервов сердца. Угол подъема кривой конечно-диастолического давления у них был меньше, а плато кривой Франка–Старлинга – более длительным. NaHS увеличивал мембранный потенциал митохондрий сердца, но не влиял на экспрессию гена UCP3. Степень восстановления показателей кардиодинамики после 20-минутной ишемии на фоне применения NaHS была существенно выше по сравнению с контрольной серией вследствие уменьшения образования митохондриальных пор. Сделан вывод, что донор сероводорода в исследуемой дозе обладает кардиопротекторным эффектом.

Ключевые слова: сероводород, изолированное сердце,

кривая Франка-Старлинга, ишемия-реперфузия, митохондриальная пора, разобщающие белки, мембранный потенциал митохондрий.

**T.V.Shimanskaya, Y.V.Goshovska,
O.M.Semenikhina, V. F. Sagach**

**EFFECT OF HYDROGEN SULFIDE
ON ISOLATED RAT HEART REACTION
UNDER VOLUME LOAD
AND ISCHEMIA-REPERFUSION**

The present study was aimed to investigate the effect of H₂S donor (NaHS) on heart function in conditions of functional loads and ischemia-reperfusion (I/R) injury by using Langendorf isolated heart perfusion. NaHS ("Sigma", 7,4 mg per kg) was dissolved in physiological solution and injected intraperitoneally 30 min before experiment. Rat isolated hearts were Langendorf-perfused and subjected to 20-minute non-flow ischemia followed by 40-minute reperfusion. The heart function was assessed by measuring the LVDP, dP/dt, coronary flow, heart rate. The opening of mitochondrial permeability transition (MPT) pore was estimated by releasing of a stable factor with UV absorbance (λ_{\max} 250 nm) into the coronary out-flow probes during the initial phase of reperfusion. The results showed that NaHS pretreated hearts developed greater LVDP without decreasing of dP/dt min in response to an increase of left ventricle volume indicating greater functional reserves and effectiveness of Frank-Starling low realization. NaHS increased cardiac mitochondrial membrane potential but did not changed UCP3 gene expression. Significant post-ischemic recover of heart function in NaHS group was accompanied with tiny quantity of mitochondrial factor releasing comparing to I/R group (p<0.001). Thus, NaHS do provides cardioprotective effect by inhibition of MPT pore opening.

Key words: hydrogen sulfide, isolated heart, Frank-Starling low, ischemia-reperfusion, mitochondrial permeability transition pore, uncoupling proteins, mitochondrial membrane potential.

O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Абрамочкин Д.В., Моисеенко Л.С., Кузьмин В.С. Влияние сероводорода на электрическую активность предсердного миокарда крысы // Бюл.эксперим. биологии и медицины. – 2009. – 147, №6. – С. 617–620.
2. Гошовська Ю.В., Шиманська Т.В., Сагач В.Ф. Застосування геніпіну – інгібітора роз'єднувальних білків – пригнічує ефект ішемічного прекодиціювання // Фізіол. журн. – 2011. – 56, № 6. – С. 38–45.
3. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття митохондриальної

- пори // Там само. – 2003. – 49, №4. – С. 6–12.
4. Струтинська Н. А., Семенихіна О.М., Чорна С.В., Вавілова Г. Л., Сагач В. Ф. Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкриття митохондриальної пори у серці дорослих і старих щурів / Там само. – 2011. – 57, №6. – С. 3–13.
5. Al-Magableh M. R., Hart J. L. Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous hydrogen sulfide production in mouse aorta // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.-2011. – 383. – P. 403–413.
6. 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. Ther. – 2006 – 316. – P. 670–678.
7. Borutaite V., Mildaziene V., Brown G.C., Brand M.D. Control and kinetic analysis of ischemia-damaged heart mitochondria: which parts of the oxidative phosphorylation system are affected by ischemia? // Biochim. and Biophys. Acta – 1995. – 1272. – P.154–158.
8. Brand M.D. in Brown G.C., Cooper C.E., Editors, Bioenergetics: a practical approach. – Oxford.: IRL Press. – 1995. – P. 39–62.
9. Chai W., Y. Wang, J.Y. Lin, X.D. Sun, L.N. Yao, Y.H. Yang, H. Zhao, W. Jiang, C.J. Gao, Q. Ding. Exogenous hydrogen sulfide protects against traumatic hemorrhagic shock via attenuation of oxidative stress // J. Surg. Res. – 2011. – 176, №1. – P. 210–219.
10. Cheang W.S., Wong W.T., Shen B., Lau C.W., Tian X.Y., Tsang S.Y., Yao X., Chen Z.Y., Huang Y. 4-aminopyridine-sensitive K⁺ channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery // Vascul. Pharmacol. – 2010. – 53, №3-4. – P. 94–98.
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. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2007. – 104, №39. – P. 15560–15565.
12. Elrod J.W., Wong R., Mishra S., Vagnozzi R.J., Sakthivel B., Goonasekera S.A., Karch J., Gabel S., Farber J., Force T., Brown J.H., Murphy E., Molkenin J.D. Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. // J Clin Invest. – 2010. – 120, №10. – P.3680–3687.
13. Entman M.L., Michael L., Rossen R.D., Dreyer W.J., Anderson D.C., Taylor A.A., Smith C.W. Inflammation in the course of early myocardial ischemia//FASEB J. – 1991. – 5. – P. 2529–2537.
14. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia/reperfusion injury: targeting the reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway// Cardiovasc Res. – 2004. – 61. –P.448–460.
15. Hill B.C., Woon T.C., Nicholls P., Peterson J., Greenwood C., Thomson A.J. Interactions of sulphide other ligands with cytochrome c oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study. //Biochem J. – 1984. – 24. – P. 591–600.

16. Hosoki R., Matsuki N., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1997. – **237**, №3. – P. 527–531.
17. Gadalla M.M., Snyder S.H. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter // *J. Neurochem.* – 2010. – **113**. – P. 14–26.
18. Geng B., Chang L., Pan C., Qi Y., Zhao J., Pang Y., Du J., Tang C. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2004. – **318**. – P. 756–763.
19. Geng B., Yang J., Qi Y., Zhao J., Pang Y., Du J., Tang C. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function // *Ibid.* – **313**, №2. – P. 362–368.
20. Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals // *Amino Acids.* – 2004. – 26. – P. 243–254.
21. Lowicka E., Beltowski J. Hydrogen sulfide the third gas of interest for pharmacologists // *Pharmacol. Reports.* – 2007. – **59**. – P. 4–24.
22. Nadtochiy S.M., Tompkins A., Brookes P.S. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischemia/reperfusion injury and precondition: implications for pathology and cardioprotection // *Biochem. J.* – 2006. – **395**. – P. 611–618.
23. 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**, №1. – P. C169–C177.
24. Sivarajah A., Collino M., Yasin M., Benetti E., Gallicchio M., Mazzon E., Cuzzocrea S., Fantozzi R., Thiernemann C. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial i/r // *Shock.* – 2009. – **31**. – P. 267–274.
25. Sun Y., Tang C.S., Du J.B., Jin H.F. Hydrogen sulfide and vascular relaxation // *Chin. Med. J.* – 2011. – **124**, №22. – P. 3816–3819.
26. Sun W.-H., Liu F., Chen Y., Zhu Y.-Ch. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2012. – **421**, №2. – P. 164–169.
27. Van Zwieten P.A. Hydrogen sulphide: Not only foul smelling, but also pathophysiologically relevant // *J. Hyperten.* – 2003. – **21**, №10. – P. 1819–1820.
28. Wang, R. Signal transduction and the gasotransmitters. NO, CO and H₂S in biology and medicine. – Totowa: Humana press, 2004. – 377 p.
29. Yong Q.C., Hu L.-F., Wang S., Huang D., Bian J.S. Hydrogen sulfide interacts with nitric oxide in the heart: possible involvement of nitroxyl // *Cardiovascular. Res.* – 2010. – **88**, №3. – P.482–491.
30. 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.
31. Zhao W., Wang R. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms // *Amer. J. Physiol. Heart. Circul. Physiol.* – 2002. – **283**. – P. 474–480.
32. Lu M., Zhao F.F., Tang J.J., Su C.J., Fan Y., Ding J.H., Bian J.S., Hu G. The neuroprotection of hydrogen sulfide against MPTP-induced dopaminergic neuron degeneration involves uncoupling protein 2 rather than ATP-sensitive potassium channels // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2012. – **17**, №6. – P. 849–859.

Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ
E-mail: tshimanskaya@gmail.com

Матеріал надійшов до редакції 13.06.2012