УДК 577.23

О.В. Акопова, А.В. Коцюруба, Ю.П. Ткаченко, В.Ф. Сагач

Оксид азоту пригнічує відкриття мітохондріальної пори і збільшує кальцієву ємність мітохондрій in vivo

Изучено влияние донора NO нитроглицерина in vivo на аккумуляцию кальция в митохондриях миокарда и печени крыс. Показано, что он вызывает быстрое (в течение 5 мин) дозозависимое повышение кальциевой емкости изолированных митохондрий с максимальным эффектом в дозах 0,5–1,0 мг/кг. Дозозависимый эффект постепенно ослабляется, хотя сохраняется в течение 30 мин после введения препарата. Наблюдается корреляция между повышением кальциевой емкости митохондрий и резким возрастанием содержания стабильных метаболитов NO (нитрозотиолов, нитрита и нитрата), активных форм кислорода (пероксид водорода, гидроксил-радикал) и продуктов пероксидации липидов (диеновые конъюгаты) в митохондриях миокарда и печени, в отличие от целой ткани, где повышение уровня активных форм кислорода и метаболитов NO не столь значительно. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что удаление кальция из цитозоля и его повышенное накопление в митохондриях (по-видимому, обусловленное блокированием митохондриальной поры оксидом азота) может лежать в основе кратковременного кардиопротекторного действия нитроглицерина, однако приводит к оксидативному стрессу этих субклеточных структур, ведущему к долговременному нарушению их энергетики и метаболизма.

ВСТУП

Дослідження останнього десятиріччя показали, що оксид азоту (NO) є одним із універсальних регуляторів фізіологічних функцій організму з надзвичайно широким спектром фізіологічної дії.

Найбільш детально дослідженим є механізм вазодилататорної дії NO, що здійснюється як цГМФ-залежним шляхом, через активацію гуанілатциклази та цГМФ-залежної протеїнкінази [6], так і безпосередньо за допомогою модуляції окисно-відновного стану клітинних тіолів, у тому числі й тих, що входять до складу структур, які утворюють активні центри ферментів, або іонні канали плазматичної мембрани і відіграють важливу роль у регуляції судинного тонусу і роботи серцевого м'яза.

Окрім всебічно дослідженого механізму вазодилататорної цГМФ-залежної дії NO, все більшу увагу привертають факти, які висвітлюють ще донедавна мало знані аспекти фізіологічних функцій NO, зокрема, його кардіопротекторної дії при патології міокарда. Так, важливим кроком на шляху до поглибленого розуміння молекулярних механізмів кардіопротекторної дії оксиду азоту стало виявлення спільності механізмів кардіопротекторної дії донорів NO та ефекту прекондиціонування за умов ішемії–реперфузії міокарда, яка, зокрема, полягає в активації деяких ізоформ протеїнкінази С, мітогенактивованих протеїнкіназ [17, 18], мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів, а також – у блокуванні мітохондріальної пори (МП) [15, 22, 23], відкриття якої, як відомо, супроводжується вивіль-

© О.В. Акопова, А.В. Коцюруба, Ю.П. Ткаченко, В.Ф. Сагач

ненням цитохрому *c* з міжмембранного простору і є пусковим механізмом апоптозу кардіоміоцитів [21, 22]. Відомі також численні експериментальні свідчення про дію NO як інгібітора каспаз, що, поряд із блокуванням МП, пригнічує індукцію апоптозу у клітинах різних типів [12, 16].

Відкриття МП, що супроводжується вивільненням речовин з молекулярною масою до 1500 Да і необоротним порушенням мітохондріальних функцій [21], є одним із чинників, що ускладнюють перебіг патологічних процесів у серцево-судинній системі і є основною причиною ураження міокарда за умов ішемії–реперфузії [5, 22].

Вивчення регуляторного впливу NO на мітохондріальні функції останніми роками привертає увагу все ширшого кола дослідників. Нині відомо, що NO є інгібітором мітохондріального дихання, його підвищений вміст у тканинах організму посилює гліколіз і знижує споживання кисню мітохондріями [6, 7]. Однак показано, що попри знижене споживання кисню, знижується і киснева вартість роботи працюючого м'яза, що може опосередковано вказувати також і на пригнічення пори [4], відкриття якої супроводжується роз'єднанням дихального ланцюга і внаслідок цього підвищеним споживанням кисню для синтезу АТФ і забезпечення енергетичних потреб клітини.

Останнім часом у науковій літературі з'явилася велика кількість повідомлень, які вказують, що оксид азоту відіграє протекторну роль щодо ушкодження мітохондрій іонами Са за умов перенавантаження ними клітин, і зокрема – шляхом пригнічення МП [12, 15, 19, 23]. Отже, зважаючи, що NO є ендогенним регулятором енергетики мітохондрій (мембранного потенціалу, дихання та синтезу АТФ), і що кардіопротекторна його дія значною мірою пов'язана з регуляцією мітохондріальних функцій, нами було поставлено за мету вивчити вплив оксиду азоту in vivo на кальційакумулюючу здатність мітохондрій, безпосередньо залежну як від мембранного потенціалу [20, 21], так і від їх чутливості до відкриття кальційзалежної пори, що призводить відповідно до зниження кальцієвої ємності органел. Для цього нами було вивчено вплив різних доз широко застосовуваного у клініці донора NO нітрогліцерину на кальцієву ємність мітохондрій міокарда і печінки щурів.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на білих щурах масою 200–250 г. Нітрогліцерин вводили внутрішньоочеревинно у дозі 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 і 2,0 мг/кг. Контрольним щурам вводили фізіологічний розчин. Серце і печінку, видалені через 5 або 30 хв після ін'єкції препарату, промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (4° C), подрібнювали і гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища: 250 ммоль/л сахарози у 20 ммоль/л тріс-HCl буфері, 1ммоль/л ЕДТА (pH 7,4). Для виділення мітохондрій гомогенат центрифугували 7 хв при 700 g (4° C), після чого супернатант центрифугували 15 хв при 11000 g (4° C). Осад суспендували у невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА і зберігали при 4° C.

Транспорт кальцію реєстрували спектрофотометрично при 654 нм при наявності 70 мкмоль/л арсеназо-III. Мітохондрії вносили у середовище наступного складу (ммоль/л): KCl – 120, KH_2PO_4 – 1, Na_2 – 1, АТФ – 1, $MgCl_2$ –1, $CaCl_2$ – 0,1, тріс-HCl-буфер – 20; pH 7,4. Концентрація білка в суспензії становила 1,0 мг/мл. Кількісну оцінку накопичення Ca^{2+} проводили, використовуючи калібрувальну криву, яку одержували титруванням суспензії мітохондрій розчинами $CaCl_2$. Кальцієву ємність визначали як максимальну кількість кальцію, акумульовану у мітохондріях протягом 2 хв і виражали у нмоль Ca^{2+} на 1 мг білка.

Концентрацію стабільних метаболітів NO – нітриту (NO_2^-) та нітрату (NO_3^-) –

досліджували спектрофотометричним методом Гріна [11]. Загальний вміст нітрозотіолів визначали як різницю між вмістом NO_2^- до і після гідролізу S–NO-зв'язку іонами двовалентної ртуті в суцільних гомогенатах тканин і мітохондріях і окремо – вміст низькомолекулярних нітрозотіолів у безбілкових фракціях, основну частку яких становить нітрозоглутатіон. Вміст високомолекулярних нітрозотіолів (нітрозильованих білків) знаходили як різницю між загальним вмістом нітрозотіолів і вмістом низькомолекулярних нітрозотіолів.

Вміст пероксиду водню (H_2O_2) визначали спектрофотометрично у KJ/лактопероксидазній системі у 0,05 моль/л фосфатному буфері (pH 7,33) при 353 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання $Є = 26000$ моль$^{-1}\cdot$ см$^{-1}$ [13].

Утворення гідроксильного радикала ($^{\cdot}OH$) оцінювали в інкубаційній суміші: 20 ммоль/л дезоксирибози, 1 ммоль/л H_2O_2 у 20 ммоль/л Na-фосфатному буфері (pH 7,4); вміст білка у пробах становив 100–250 мкг [8]. Після 60 хв інкубації при 37°C додавали рівні об'єми 1%-ї тіобарбітурової кислоти в 50 ммоль/л NaOH і 2,8%-ї трихлороцтової кислоти, витримували на водяній бані (100°C) протягом 20 хв і охолоджували. Генерацію $^{\cdot}OH$-радикала оцінювали за зміною поглинання при 532 нм і виражали в одиницях поглинання ΔE за 30 хв на 1 мг білка.

Пероксидацію ліпідів оцінювали за вмістом дієнових кон'югатів, визначаючи поглинання гептанових екстрактів проб при 232 нм [2]. Вміст вільного заліза (Fe^{2+}) визначали за стандартною методикою, використовуючи реактиви фірми «Філісит Діагностика» (Україна).

Достовірність результатів оцінювали за критерієм t Стьюдента. Величину $P<0,05$ вважали статистично значимою.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У табл. 1 наведено результати вивчення дії нітрогліцерину на кальційакумулюючу здатність мітохондрій міокарда і печінки щурів. Уже через 5 хв після введення препарату відбувається різке дозозалежне збільшення кальцієвої ємності у мітохондріях міокарда та печінки у 2,4–2,9 і 2,4 раза ($P<0,05$) відповідно. Максимальний ефект при цьому спостерігався при дозі нітрогліцерину 0,5–1,0 мг/кг. Подальше збільшення дози до 1,5–2,0 мг/кг призводило до поступового зниження кальцієвої ємності до рівня контрольних значень. Слід зазначити, що подібне різке збільшення кальцієвої ємності мітохондрій не супроводжувалося відповідним збільшенням мембранного потенціалу органел (результати не наведено). Вплив нітрогліцерину на накопичення кальцію мітохондріями є досить тривалим і проявляється навіть через 30 хв після введення препарату (див. табл. 1).

Оскільки введення нітрогліцерину in vivo практично не впливало на мембранний потенціал ізольованих мітохондрій, від якого

Таблиця 1. Вплив нітрогліцерину (мг/кг) in vivo на кальцієву ємність (нмоль/мг) білка ізольованих мітохондрій міокарда і печінки щурів (M±m; n=4)

Доза нітрогліцерину	Міокард		Печінка
	5 хв	30 хв	5 хв
0	38,2±6,2	38,2±6,2	92,0±5,0
0,25	56,5±2,5*	50,0±3,6*	190,5±7,4*
0,5	93,5±3,5*	-	222,5±4,7*
1,0	110,0±8,0*	92,6±4,6*	222,5±4,7*
1,5	55,0±5,0*	90,8±9,5*	-
2,0	-	30,2±1,6	-

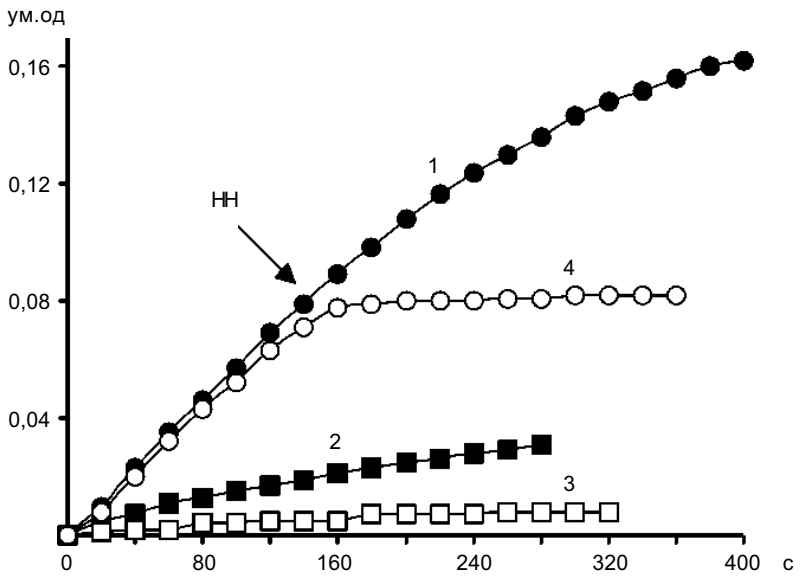
Примітка. Тут і в табл. 2, 3 * $P<0,05$ різниця достовірна відносно контролю (фізіологічний розчин).

залежить накопичення Ca^{2+} у матриксі через кальцієвий уніпортер [20], можна висловити припущення, що блокування МП оксидом азоту [12, 15, 23] є однією з вірогідних причин значного зростання кальцієвої ємності органел (див. табл. 1), і таким чином, посилена акумуляція кальцію у мітохондріях, а також видалення іонів Са із цитозолю, може брати участь у механізмі вазодилататорної дії оксиду азоту і його препаратів-донорів.

Відомо, що вплив NO на МП може здійснюватися різними шляхами: як безпосередньо, через зв'язування з функціонально важливими тіоловими групами білків, що входять до складу пори (на подібний механізм вказують дані про блокування донором NO, нітропрусидом натрію, індукованого феніларсиноксидом відкриття пори, яке відбувається через окиснення певних «критичних» тіолових груп [4]), так і опосередковано, за допомогою регуляції мембранного потенціалу мітохондрій, і відповідно, здатності органел до накопичення та утримання кальцію у мітохондріальному матриксі [19].

Нещодавно нами було показано [1], що під дією донорів NO in vitro відбувається дозо-залежне зниження кальцієвої ємності мітохондрій печінки щурів, яке корелює з відповідним зниженням мембранного потенціалу. Водночас вивільнення кальцію з мітохондріального матриксу під дією донора NO, зумовлене мембранною деполяризацією, є цілком чутливим до блокатора уніпортера рутенієвого червоного, що свідчить на користь блокування МП оксидом азоту [1].

Оскільки літературні дані про безпосередню дію оксиду азоту на МП є досить суперечливими [6], нами було поставлено за мету з'ясувати вплив донорів NO – нітропрусиду натрію та нітрогліцерину – на відкриття МП за умов, що виключають опосередковану дію NO через зниження матриксного вмісту кальцію. Для цього донори NO вносили в інкубаційне середовище після завершення транспорту Ca^{2+} і вивчали їх вплив на нечутливе до рутенієвого червоного вивільнення катіона, зумовлене відкриттям МП (рис. 1, крива 1). Результати проведеного нами дослідження



Вплив нітрогліцерину (НГ) та нітропрусиду натрію (НН) на циклоспорин А-чутливе вивільнення кальцію із мітохондрій печінки щурів при наявності рутенієвого червоного: 1 – рутенієвий червоний (10^{-5} моль/л); 2 – НГ ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л); 3, 4 – НН (10^{-3} моль/л). Стрілкою на кривій 4 вказано внесення НН через 160 с від початку реєстрації транспорту. За віссю абсцис – час; за віссю ординат – поглинання при 654 нм

показали, що введення донорів NO за цих умов блокує як відкриття пори (рисунок, криві 2,3), так і функціонально активну МП (див. рисунок, крива 4).

Водночас слід зазначити, що in vivo ситуація набагато ускладнюється залученням механізмів клітинної сигналізації (що полягає в активації широкого спектра протеїнкіназ, експресії ранніх генів, активації ліпідного метаболізму) у відповідь на дію NO і нітрогліцерину зокрема. Як вже зазначалось, багато авторів дедалі частіше відмічають спільність механізмів кардіопротекторної дії NO і прекондиціонування міокарда при ішемії–реперфузії [10, 17, 23]. Отже, можна припустити, що дія NO in vivo може бути спрямована як опосередковано, за допомогою модуляції потенціалу та матриксного вмісту кальцію [1, 19], так і безпосередньо, на блокування пори через модифікацію (наприклад нітрозилювання) критичних тіолів трансмембранного білкового комплексу, до складу якого входить порин зовнішньої мембрани, потенціалзалежний аніонний канал, білок внутрішньої мембрани, транслоказа аденіннуклеотидів, і матриксний білок, циклофілін D [9], або за посередництвом певних клітинних механізмів – на блокування комплексоутворення, фолдингу пори. Так, нещодавно одержано дані [23], які вказують на транслокаазу аденіннуклеотидів як мішень для кардіопротекторної дії NO, пов'язаної з блокуванням МП за умов ішемії–реперфузії міокарда. Відомо, що NO може посилювати і експресію антиапоптозних білків сімейства Bcl, які також пригнічують МП [14, 22, 23].

Оскільки було виявлено достовірну залежність збільшення кальцієвої ємності мітохондрій від дози нітрогліцерину, яка зберігається тривалий час (див. табл. 1), нами було поставлено за мету з'ясувати кореляцію між зміною цього показника і зміною вмісту активних форм азоту внаслідок введення донора NO. Для оцінки рівня активних форм азоту визначали вміст стабільних метаболітів NO – нітриту, нітрату, а також нітрозильованих високомолекулярних білків і низькомолекулярних нітрозотіолів, основну частку яких становить нітрозоглутатіон (табл. 2). Для оцінки впливу екзогенного NO на рівень активних форм кисню визначали вміст пероксиду водню та гідроксил-радикала в ізольованих мітохондріях міокарда і печінки а також – у цілій тканині печінки щурів (табл. 3). Для оцінки оксидативного ушкодження органел досліджували вміст продуктів ПОЛ (дієнових кон'югатів) і вміст вільного заліза (див. табл.3), оскільки відомо, що Fe^{2+} є каталізатором багатьох вільнорадикальних реакцій з утворенням активних форм кисню та азоту, таких, як широковідома реакція Фентона з утворенням високотоксичного $^{\cdot}OH$-радикала, а також вступає у реакції з клітинними нітрозотіолами, внаслідок яких утворюються високореактивні динітрозильні комплекси заліза [2].

Результати дослідження показують, що вже через 5 хв дії нітрогліцерину відбувається стрибкоподібний приріст вмісту метаболітів NO у мітохондріях, особливо у порівнянні зі значеннями, одержаними для цілої тканини печінки, причому для всіх показників характерною є залежність від дози нітрогліцерину (див. табл. 2).

Одночасно відбувається різке підвищення вмісту активних форм кисню у мітохондріях (див. табл. 3). Особливо помітною у цьому разі також є значна (у десятки разів) відмінність між приростом вмісту активних форм кисню у мітохондріях щодо цілої тканини. Так, вміст пероксиду водню після 5-хвилинної дії нітрогліцерину у дозі 1 мг/кг у мітохондріях печінки збільшувався від 47,1±2,2 до (830,3±79,5) нмоль/мг білка, тоді як у тканині печінки від 7,02±0,65 до (11,58±1,92) нмоль/мг білка. Наведене спостереження стосується і зміни вмісту гідроксил-радикала (див. табл. 3) та нітрат-аніона, підвищення вмісту якого у 30,7 раза у мітохондріях міокарда та у 22,7 раза у мітохондріях печінки суттєво відрізняється від досить помірного збільшення його

вмісту у 2,3 раза у тканині печінки (див. табл. 2). Натомість спостерігається досить помірний приріст вмісту нітрозотіолів (1,3–2,3 раза), який до того ж мало відрізняється у мітохондріях і цілій тканині. Ймовірно, що при короткотерміновій дії нітрогліцерину базальний клітинний пул NO, депонований у вигляді низькомолекулярних нітрозотіолів і нітрозильованих білків мало змінюється і залишається майже незадіяним у швидкій реакції клітин на дію препарату. Досить несподіваним є незначний приріст вмісту нітрит-аніона (у 2,4–3,2 раза) у порівнянні з більш ніж 10-кратним приростом вмісту NO_3^- (див. табл. 2). Подібна різниця спостерігається саме у мітохондріях міокарда і печінки, на відміну від цілої тканини, де вміст NO_2^- та NO_3^- збільшується в 1,2–2,3 раза відповідно. На нашу думку, подібну відмінність можна пояснити значним збільшенням вмісту високореактивних активних форм кисню, особливо гідроксил-радикала (див. табл. 3) і прооксидантів (так, вміст Fe^{2+} збільшується у десятки разів), високий вміст яких може призводити до окиснення утворюваного нітриту до нітрату – кінцевого продукту окиснення NO, а також, можливо, до декомпозиції утворюваних нітрозотіолів, також з окисненням NO до NO_3^-.

Таким чином, саме у мітохондріях, у порівнянні з цілою тканиною, під дією нітрогліцерину спостерігається найбільш помітний дозозалежний приріст вмісту метаболітів NO та активних форм кисню, який добре корелює із дозозалежним збільшенням кальцієвої ємності мітохондрій і може вказувати на підвищене надходження кальцію у мітохондрії. Добре відомо, що кальцій є ендогенним регулятором

Таблиця 2. Вплив нітрогліцерину (мг/кг) на вміст нітриту, нітрату та низькомолекулярних і високомолекулярних нітрозотіолів у мітохондріях серця і печінки та у гомогенаті печінки щурів (M±m; n=5)

Доза нітрогліцерину	NO_2^-, нмоль/мг білка	NO_3^-, нмоль/мг білка		Нітрозотіоли, нмоль/мг білка	
				Нітрозоглутатіон	Високомолекулярні нітрозотіоли
	5 хв	5 хв	30 хв	5 хв	5 хв
		Мітохондрії серця			
0	8,3 ±0,7	45,4±6,2	54,9±6,2	86,2±6,5	575,1±34,4
0,25	11,1±1,4	293,3±36,5*	66,5±8,7	116,5±17,9	839,6±171,5
0,5	12,9±1,7	899,1±94,7*	126,0±15,4*	118,3±18,4	1070,3±150,2*
1,0	19,8±2,4*	1394,9±121,1*	81,2±11,3	200,7±31,7*	1325,7±189,1*
1,5	18,1±3,3*	1297,5±205,4*	75,6±10,2	202,4±28,6*	1265,4±77,4*
		Мітохондрії печінки			
0	11,6±0,97	32,4±2,6	43,9±3,6	136,4±15,0	705,2±47,9
0,25	17,7±2,62	397,4±51,7*	68,4±8,4	213,2±32,7	1190,4±138,7
0,5	37,8±4,95*	871,1±112,4*	89,3±11,2*	294,8±41,8*	1260,0±165,9
1,0	23,4±3,58*	736,4±96,5*	144,4±17,5*	297,5±37,4*	1745,6±246,4*
1,5	11,8±1,77	414,4±61,2*	165,8±20,0*	279,2±18,9*	2260,9±285,1*
		Печінка			
0	124,0±11,0	119,2±8,5		296,1±25,1	896,5±42,7
0,25	136,5±18,3	142,2±22,2		371,6±44,9	1463,7±176,5
0,5	142,4±16,9	271,3±41,3*	-	391,2±57,2	1589,5±202,9*
1,0	131,6±21,5	178,8±24,3*		386,9±60,7	2042,1±311,6*
1,5	126,1±19,1	107,0±14,6		378,2±59,7	2589,3±422,5*

мітохондріальних дегідрогеназ, а також, за літературними даними – і мітохондріальної NO-синтази, яку відносять до кальцій-залежних ізоформ ферменту, нейрональної NO-синтази (NOS) [6,7]. Зважаючи на достовірну кореляцію зі збільшенням кальцієвої ємності мітохондрій, можна припустити, що саме посилене надходження кальцію до мітохондріального матриксу, зумовлене дією нітрогліцерину, є причиною різкої стимуляції утворення метаболітів NO, пероксидів і вільнорадикальних похідних кисню внаслідок кальційзалежної активації мітохондріальних ферментів – комплексів дихального ланцюга та мітохондріальної NOS. На активацію останньої в умовах експерименту опосередковано вказує достовірне ($P<0,05$) збільшення вмісту L-цитруліну, продукту перетворення L-аргініну, що каталізується NOS, від 0,45±0,05 до (5,90±0,72) нмоль/мг білка у мітохондріях міокарда та від 0,45±0,06 до (2,46±0,31) нмоль/мг білка у мітохондріях печінки через 5 хв після введення нітрогліцерину у дозі 1 мг/кг.

Слід відмітити добре помітну кореляцію між максимальним приростом кальцієвої ємності та максимальним вираженням оксидативного стресу у мітохондріях при 30-хвилинній дії нітрогліцерину у дозі 1,0–1,5 мг/кг. Так, на фоні різкого підвищення вмісту активних форм кисню спостерігається значний приріст вмісту продуктів ПОЛ, дієнових кон'югатів, маркерів оксидативного пошкодження органел (див. табл. 3).

Слід зазначити, що механізм дії нітроглі-

Таблиця 3. Вплив нітрогліцерину (мг/кг) на вміст активних форм кисню, дієнових кон'югатів і вільного заліза у мітохондріях міокарда і печінки щурів і у гомогенаті печінки щурів (M±m; n=5)

Доза нітрогліцерину	H_2O_2, нмоль/мг білка	Гідроксил-радикал, $\Delta E \cdot 10^3$/30 хв на 1 мг білка	Дієнові кон'югати, нг/мг білка	Fe^{2+}, нмоль/мг білка
	5хв	5 хв	30 хв	5 хв
Мітохондрії серця				
0	95,0±7,4	33,0±2,8	3,60±0,27	0,12±0,01
0,25	154,1±18,2	47,0±7,1	14,85±1,98*	0,43±0,06*
0,5	170,0±21,7*	50,7±9,5	25,9±3,59*	0,93±0,15*
1,0	221,3±30,9*	84,7±12,7*	33,2±4,16*	3,52±0,54*
1,5	269,7±42,4*	98,4±14,6*	60,5±8,96*	6,23±0,71*
Мітохондрії печінки				
0	47,1±2,2	34,1±2,7	2,86±0,16	0,17±0,02
0,25	281,9±36,8*	225,9±36,2*	9,28±1,23*	3,50±0,47*
0,5	609,7±92,7*	309,5±28,5*	18,2±1,95*	9,12±1,54*
1,0	830,3±79,5*	90,7±11,6*	57,7±6,27*	36,1±4,12*
1,5	1850,8±213,6*	61,5±5,8*	41,3±5,19*	9,4±1,47*
Печінка				
0	7,02±0,65	1,98±0,22		
0,25	8,50±1,10	3,46±0,46		
0,5	8,69±1,33	3,66±0,50*	-	-
1,0	11,58±1,92*	3,74±0,42*		
1,5	5,55±0,84	4,86±0,72*		

церину саме на транспорт кальцію із цитозолю в мітохондрії та з мітохондрій у цитозоль in vivo залишається нині невизначеним. Можна висловити припущення, що однією з причин значного збільшення кальцієвої ємності мітохондрій, поряд із блокуванням МП, також є і активація власне транспортного механізму Ca^{2+}. На нашу думку, транспорт кальцію до мітохондріального матриксу може значно полегшуватися через його котранспорт з проникаючим мітохондріальну мембрану NO_3^-, концентрація якого збільшується у мітохондріях у десятки разів, за механізмом, аналогічним дії інших мембранопроникних аніонів (ацетату та фосфату) на транспорт кальцію.

Таким чином, одержані нами результати вносять певні корективи в уявлення щодо протекторної дії NO на мітохондрії, оскільки значний нітрозативний та оксидативний стрес, причиною якого є посилене надходження іонів Са у мітохондріальний матрикс, має призводити до значних порушень метаболізму у цих субклітинних структурах. Результати проведеного нами експерименту дають підстави для висновку, що посилена акумуляція кальцію у мітохондріях під дією донора NO, хоча і здійснює короткотривалий цитопротекторний ефект внаслідок видалення кальцію із цитозолю, блокування МП і пригнічення апоптогенних процесів, однак, за умов більш тривалої дії може призводити до руйнівних наслідків для мітохондрій і необоротного порушення енергетичного метаболізму клітин.

O.V. Akopova, A.V. Kotsiuruba, Yu.P. Tkachenko, V.F. Sagach

NITRIC OXIDE SUPPRESSES PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING AND ENHANCES CALCIUM UPTAKE IN MITOCHONDRIA IN VIVO

The influence of an NO donor, nitroglycerine (NG) on Ca^{2+} accumulation in rat heart and liver mitochondria was studied. A rapid dose-dependent increase in Ca^{2+}-uptake was observed within 5 min after NG injection in vivo, with a peak in NG concentration of 0,5-1,0 mg /kg body weight. There is a correlation between a dose-dependent increase in Ca^{2+}-accumulating capacity of mitochondria and sharp dose-dependent rise in stable NO metabolites level (NO_2^-, NO_3^- and nitrosothiols) and reactive oxygen species (H_2O_2 and hydroxyl radical, $^{\cdot}OH$) as well as lipid oxidation products (diene conjugates), the markers of the oxidative damage of the organelles in mitochondria in comparison to a whole tissue (liver) where only moderate increase of ROS and NO metabolites was detected. A 20-30-fold increase of NO_3^- level from 32,4±2,6 to 736,4±96,5 nmol/mg protein ($p<0,05$) and from 45,4±6,2 to 1395,0±121,1 nmol/mg protein ($p<0,05$) in liver and heart mitochondria respectively also provide a strong evidence for nitrosative stress. The results obtained suggest that calcium elimination from cytosol and its increased accumulation in mitochondria (likely dependent on permeability transition pore blockade by NO) could account for the cardioprotective action of NG although resulted in the development of oxidative stress with following long-term alterations of the energy supply and metabolism of subcellular structures.

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

A.V. Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Акопова О.В., Сагач В.Ф. Влияние доноров NO на аккумуляцию кальция в митохондриях миокарда и печени крыс //Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, №2. – С.82–87.
2. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биологических системах // Биохимия. – 1998. – **63**, №7. – С.924–938.
3. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лаб. дело. – 1988. – №2. – С.60–64.
4. Сагач В.Ф., Богуславський А.Ю., Дмитрієва А.В., Надточій С.М. Роль оксиду азоту та мітохондріальної пори в зміні кисневих режимів працюючого скелетного м'яза // Фізіол. журн. – 2004. – **50**, №2. – С.6–12.
5. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // Фізіол. журн., 2003. – **49**, №4. – С.6–12.
6. Серая И.П., Нарциссов Я.Р. Современные представления о биологической роли оксида азота // Успехи совр. биологии. – 2002. – **122**, №3. – С. 249–258.
7. Brown G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration //Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – **1411**. – P.351–369.
8. Conte D., Narindrasorosa K.S., Sarcar B. In vivo and

in vitro iron-replaced zinc finger generated free radicals and caused DNA damage // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, №9. – P.5125–5130.
9. Crompton M., Barksby E., Johnson N., Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death // Biochimie. – 2002. – **84**, №2. – P.143–152.
10. Geusch G. Nitroglycerin and delayed preconditioning in humans. Yet another mechanism for an old drug? // Circulation. – 2001. – **103**, №24. – P. 2876–2878.
11. Green L.C., David A.W., Glogovski J. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, №1. – P.131–138.
12. Hatano E., Bennett B.L., Manning A.M. et al. NF-kB stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF-a- and Fas-mediated apoptosis // Gastroenterology. – 2001. – 120, №5. – P. 1251–1262.
13. Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase (H_2O_2) iodide system // Eur. J. Biochem. – 1984. – **141**, №1. – P. 69–74.
14. Ing D.J., Zang J., Dzau V.J., Bishopric N.H. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak and Bcl-x //Circulat. Res. – 1999. – **84**, №1. – P. 21–33.
15. Kim J.S., Ohshima S., Pediaditakis P., Lemasters J.J. Nitric oxide protect rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition // Hepatology. – 2004. – **39**. – P. 1533–1543.
16. Li J., Bombeck C.A., Yang S., Kim Y.M., Billiar T.R. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes // J. Biol. Chem. – 1999. – **274**. – P. 17325–17333.
17. Ping P., Takano H., Zhang J. et al. Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning // Circulat. Res. – 1999. – **84**. – P. 587–604.
18. La Pointe M.C., Isenovic E. Interleukin-1b regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes // Hypertension. – 1999. – 33. – P. 276–282.
19. Rakhit R.D., Mojet M.H., Marber M.S., Duchen M.R. Mitochondria as targets for nitric oxide-induced protection during simulated ischemia and reoxygenation in isolated neonatal cardiomyocytes // Circulation. – 2001. – **103**, №21. – P. 2617–2623.
20. Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game // J. Physiol. – 2000. – **529**, №1. – P. 37–47.
21. Sculachev V.P. Mitochondrial physiology and pathology: concepts of programmed death of organelles, cells and organisms // Mol. Asp. Med. – 1999. – **20**. – P. 139–184.
22. Weiss J.N., Korge P., Honda H.M., Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease // Circulat. Res., 2003. – **93**. – P. 292–301.
23. Wang G., Liem D.A., Vondriska T.M. et al. Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction via modulation of mitochondrial permeability transition // Amer. J. Physiol. – 2005. – **288**. – P. H1290–H1295.

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 14.04.2005