

Ю.В. Гошовська, Ю.П. Коркач, Т.В.Шиманська, А.В. Коцюруба, В.Ф.Сагач

## Вплив блокади роз'єднувальних білків мітохондрій на систему синтезу оксиду азоту і розвиток окисного стресу при ішемії–реперфузії серця старих щурів

*На моделі перфузованого за Лангендорфом ізольованого серця старих щурів вивчали вплив геніпіну, який має здатність пригнічувати UCP (від англ. uncoupling protein)-залежний протонний потік через внутрішню мітохондріальну мембрану, на систему оксиду азоту та розвиток окисного стресу, викликаного ішемією–реперфузією. Ішемія–реперфузія серця старих щурів супроводжувалася підвищенням вмісту супероксидного і гідроксильного радикалів, пероксиду водню, пригніченням активності конститутивної NO-синтази (NOS), утворенням пероксинітриту та розвитком нітрозативного стресу. Перфузія ізольованого серця геніпіном у дозі 10-5моль/л протягом 15 хв до ішемії запобігала утворенню вільних радикалів кисню та окисненню ліпідів мембран. Геніпін стимулював активність конститутивної NOS, однак проявляв інгібіторні властивості щодо експресії індукбельної NOS. Постішемичне відновлення показників кардіодинаміки було пригнічене внаслідок „вимкнення” продукції NO саме індукбельною NOS, яка відіграє важливу роль у ранні періоди реперфузії. Дійшли висновку, що геніпін є потужним антиоксидантом і демонструє інсуліноподібну активність, зумовлену його здатністю керувати продукцією NO на рівні внутріклітинних сигнальних каскадів.*

*Ключові слова: ішемія–реперфузія, окисний стрес, геніпін, NO-синтаза, старіння, роз'єднувальні білки.*

### ВСТУП

Нищівний вплив відновлення кровотоку в міокарді після тривалої ішемії зумовлений так званим вільнорадикальним вибухом, який супроводжується утворенням активних форм кисню (АФК) та азоту (АФА) [5], руйнуванням білкових і ліпідних структур клітини, що призводить до дисфункції мітохондрій кардіоміоцитів. Білки UCP (від англ. uncoupling protein), які локалізовані на внутрішній мембрані мітохондрій, каталізують витік протонів з міжмембранного простору в матрикс мітохондрій, роз'єднуючи окисне фосфорилування. Дані літератури свідчать, що активація UCP-опосередкованого протонного потоку, яка може здійснюватися супероксидним радикалом [13], супроводжується зниженням мемб-

ранного потенціалу і гальмуванням його продукції комплексом І дихального ланцюга [8]. Така взаємна регуляція захищає клітини від вільнорадикального пошкодження, індукованого АФК та АФА, яке спричиняє повільне старіння організму. З літератури відомо, що у мишей з дефіцитом UCP2 або UCP3 розвиваються ознаки окисного стресу [29]. Нещодавно було показано [31], що протонпровідну активність UCP2 можна пригнічувати за допомогою геніпіну – метаболіту геніпозиду, який міститься в екстрактах плодів *Gardenia jasminoides* Ellis. Цю рослину успішно використовують в китайській медицині для лікування цукрового діабету, який також супроводжується розвитком окисного стресу і порушеннями синтезу оксиду азоту. Схожі порушення спостерігаються при старінні та ішемії-

© Ю.В. Гошовська, Ю.П. Коркач, Т.В.Шиманська, А.В. Коцюруба, В.Ф.Сагач

реперфузії. Тому метою нашої роботи було з'ясування ефектів геніпіну – блокатора активності UCP2 – на розвиток окисного стресу та синтез оксиду азоту в серцях старих тварин при ішемії-реперфузії.

## МЕТОДИКА

Експерименти проводили на самцях старих щурів лінії Вістар віком 24 міс, масою 450–550 г. Ретроградну перфузію коронарних судин ізольованого серця здійснювали розчином Кребса-Хензеляйта (ммоль/л): NaCl – 118, KCl – 4,7, MgSO<sub>4</sub> – 1,2, NaHCO<sub>3</sub> – 24, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2, глюкоза – 10, CaCl<sub>2</sub> – 2,5), який аерувався карбогеном (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) при 37°C. Тотальну ішемію міокарда моделювали 20-хвилинним припиненням перфузії з наступною реперфузією (40 хв). Геніпін («Wako Inc.», США) вводили в перфузійний розчин у дозі 10-5 моль/л за 15 хв до ішемії. Реєстрацію показників кардіодинаміки та розрахунок кисневої вартості роботи серця здійснювали як описано нами раніше [2].

Для біохімічних досліджень серця негайно заморожували у рідкому азоті. Інтенсивність окисного метаболізму у гомогенатах серця старих щурів оцінювали за зміною швидкості генерації нестабільних вільних радикалів кисню – супероксидного аніон-радикала ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) [21] і  $\cdot\text{OH}$ -радикала [17], та за змінами вмісту стабільного пероксиду водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [18] і кінцевого продукту переокисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – малонового діальдегіду [24].

Інтенсивність *de novo* генерації NO оцінювали, визначаючи активність різних ізоформ NO-синтаз: кальційнезалежної iNOS та кальційзалежної cNOS за утворенням цитруліну, вмісту нітрит-аніона (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) [14] і нітрат-аніона (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) [27].

Інтенсивність реутилізаційної генерації NO оцінювали, визначаючи нітратредуктазною активністю при зміні вмісту NO<sub>3</sub><sup>-</sup> в інкубаційному середовищі за наявності

надлишку НАДН. Аргіназну активність, що є конкурентною до NO-синтазної і продукує поліаміни, при ферментативній деградації яких утворюються великі кількості H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> і токсичних альдегідів, визначали спектрофотометричним методом [4]. Цитрулін, що є подуктом різних NO-синтаз і утворюється одночасно з NO, тим самим виступаючи маркером генерації останнього, вивчали також спектрометричним методом [7], а вміст сечовини – за допомогою добірки реактивів «Філіст-Діагностика», Україна. Концентрацію білка в пробах визначали за методом Бредфорд [9].

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою MS Excell з використанням методу різниць та виражали у вигляді середнього±стандартне відхилення. Застосовуючи критерій t Стьюдента, достовірними вважали зміни при P<0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Розвиток окисного стресу при ішемії-реперфузії міокарда та попередження його геніпіном.* Як відомо, тривала ішемія та наступна реперфузія міокарда супроводжується збільшенням швидкості утворення АФК і АФА, що має наслідком ініціацію ПОЛ [5]. Одним з основних джерел утворення АФК за різних хронічних патологічних станів та при старінні виступають мітохондрії [22]. Ішемія–реперфузія є зручною експериментальною моделлю для модуляції функцій мітохондрій та дослідження механізмів генерації АФК та АФА. Як показали наші дослідження, у серцях старих щурів за ішемії–реперфузії спостерігається значне (майже в три рази) збільшення швидкості генерації супероксидного аніону (табл. 1). Причиною цього може бути активація ксантиноксидази та оксидаз ліпідів. Крім того вміст пероксиду водню збільшується вдвічі, а швидкість утворення гідроксильного радикала – в 2,5 раза. Це супроводжується значною активацією

**Таблиця 1. Вплив ішемії–реперфузії та попереднього введення геніпіну на профіль вільних радикалів кисню та вміст малонового діальдегіду у тканинах серця старих щурів ( $M \pm m$ ;  $n=5-6$ )**

Показник	Контроль	Ішемія–реперфузія	Геніпін і ішемія–реперфузія
$O_2^-$ , ум. од	$5,708 \pm 0,58$	$15,51 \pm 1,49^{***}$	$8,288 \pm 0,44^{**}, ###$
$H_2O_2$ , пмоль/мг білка	$3,914 \pm 0,54$	$7,26 \pm 1,23^*$	$1,113 \pm 0,26^{***}, ###$
$\cdot OH$ , ум. од.	$1,648 \pm 0,19$	$4,113 \pm 0,38^{***}$	$0,373 \pm 0,10^{***}, ###$
Малоновий діальдегід, Нмоль/мг білка	$18,36 \pm 2,64$	$35,9 \pm 3,68^{**}$	$3,55 \pm 0,51^{***}, ###$

Примітка. Тут і в табл.2 \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  – відносно значень у контролі.

#  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  – відносно значень у групі з ішемією–реперфузією.

ПОЛ, про що свідчить збільшення вмісту – малонового діальдегіду – майже вдвічі. В наших експериментах ішемія–реперфузія супроводжувалась одночасним підвищенням вмісту як  $H_2O_2$ , так і  $\cdot OH$ -радикала. Можливо, що основним шляхом генерації останнього в серці старих тварин за умов ішемії–реперфузії є не лише «традиційний» – утворення з  $H_2O_2$  у реакції Фентона за наявності іонів металів ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) [1], – але й за рахунок посилення розпаду пероксинітриту, який може утворитися при одночасній інтенсивній генерації супероксид-аніона, та оксиду азоту, що відбувається в умовах нашого експерименту. Таким чином, ішемія–реперфузія стимулювала розвиток окисного стресу в тканинах серця старих щурів.

Попередня перфузія коронарних судин блокатором активності UCP2 геніпіном призводила до істотного, навіть нижче від значень у контрольній групі, зниження продукції АФК у відповідь на ішемію–реперфузію (табл. 1). Це свідчить про потужні антиоксидантні властивості геніпіну, характеризує його як інгібітора генерації АФК та активації ПОЛ (зниження вмісту малонового діальдегіду в 10 разів). Слід відмітити надмірне інгібування генерації АФК геніпіном у обраній дозі, адже посилення цього процесу з віком може носити адаптаційний характер, оскільки відомо, що та кількість АФК і продуктів ПОЛ, яка продукується за фізіологічних умов, бере участь у деяких процесах, зокрема у

трансдукції сигналів [11, 15], мобілізації кальцію з саркоплазматичних та мітохондріальних депо, активації  $Na^+H^+$ -обмінника тощо. Крім того є свідчення, що збільшення генерації  $H_2O_2$  призводить до посилення експресії ендотеліальної NO-синтази (eNOS) на транскрипційному та трансляційному рівнях [10, 32], а супероксидний аніон є потужним підсилювачем експресії iNOS, тобто кальційнезалежного de novo синтезу NO [3]. Відомо, що АФК є одними з медіаторів ішемічного прекодиціювання [28]: короткі ішемічні періоди стимулюють збільшення фонового рівня АФК, що «готує» серце до наступної тривалої гіпоксії, і, як наслідок, ранній реперфузійний період проходить зі значно меншими морфологічними і функціональними пошкодженнями міокарда.

Таким чином, надмірне зменшення генерації АФК у тканинах серця після ішемії–реперфузії на тлі введення геніпіну може бути причиною зниженої толерантності міокарда до ішемічного пошкодження, яке ми спостерігали в наших експериментах (рис. 1).

*Вплив геніпіну на систему синтезу оксиду азоту при ішемії–реперфузії міокарда.* Як відомо, оксид азоту, що генерується при окисненні L-аргініну кальційзалежним ферментом cNOS, відіграє одну з провідних ролей у регуляції функціональної активності міокарда завдяки своїм вазодилататорним ефектам [26]. Важливим є також кальційнезалежний синтез NO фер-

ментом iNOS. На моделі трансгенних мишей було з'ясовано, що гіперекспресія останньої не призводить до скоротливої дисфункції міокарда чи інших незворотних ефектів [16, 19, 30]. Але щодо важливості iNOS є певні заперечення. Особливо це

стосується ранніх періодів реперфузії. Є дані щодо кардіопротекторної ролі iNOS лише у віддалені строки реперфузії [6]. Водночас базальна активність iNOS часто просто ігнорується. Тому цікавим для нас було вивчення різних шляхів синтезу NO за умов ішемії–реперфузії та ефект попереднього введення геніпіну.

Як видно з табл. 2, після ішемії–реперфузії міокарда старих тварин активність ферментів *de novo* синтезу NO значно не змінювалася. Відомо, що при підвищенні аргіназної активності збільшується вміст продуктів розпаду аргініну до сечовини та орнітину з наступним утворенням великої кількості поліамінів, які в свою чергу є джерелом утворення пероксиду водню під дією ферментів оксидаз. Активність ферменту аргінази, що конкурує з cNOS за спільний субстрат – L-аргінін – в наших експериментах так само не змінювалася, що свідчить, з одного боку, про достатній вміст ендogenous L-аргініну для кальцій-залежного синтезу NO, а з другого – про відсутність вкладу аміноксидазного шляху утворення  $H_2O_2$  внаслідок деградації поліамінів при ішемії–реперфузії серця старих щурів. Знижений вміст сечовини (див. табл. 2) за цих умов не здійснює інгібіторного впливу на цитруліновий цикл ресинтезу L-аргініну.

У той же час активність НАДН-залежної нітратредуктази збільшувалась у 1,5 раза (див. табл. 2), що вказує на інтенсифікацію реутилізаційного синтезу NO не лише в період ішемії, але й після 40 хв реперфузії. Варто відмітити, що нітратредуктаза активується за гіпоксичних станів, тому збільшення її активності в умовах нашого експерименту свідчить про нестачу кисню у тканинах серця та ефективність нашої моделі ішемічного пошкодження міокарда. Також спостерігалися зміни пулів стабільних метаболітів NO: вміст  $NO_3^-$  збільшився вдвічі, причиною чому може бути розпад пероксинітриту при надмірній одночасній генерації NO та супероксидного аніон-

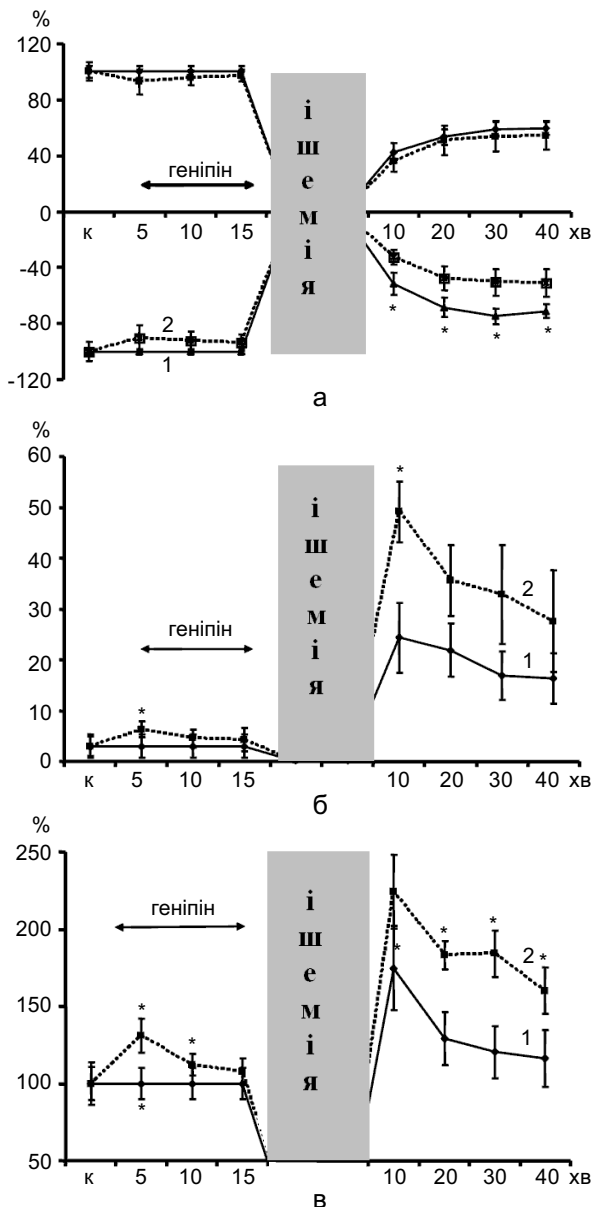


Рис. 1. Вплив ішемії–реперфузії та попереднього введення геніпіну на швидкість скорочення та розслаблення міокарда (а), кінцево-діастолічний тиск (б) та кисневу вартість роботи серця (в) старих щурів: 1 – контроль, 2 – введення геніпіну

**Таблиця 2. Вплив ішемії–реперфузії та попереднього введення геніпіну на систему оксиду азоту у тканинах серця старих щурів (M ± m; n=5–6)**

Показник	Контроль	Ішемія–реперфузія	Геніпін і ішемія–реперфузія
NO-синтаза, пмоль/мг білка			
індуцибельна	4,12 ± 0,847	3,018 ± 0,3	0,771 ± 0,067**,###
конститутивна	1,846 ± 0,19	2,215 ± 0,39	4,66 ± 0,385***,##
Нітратредуктаза, нмоль/мг білка	1,532 ± 0,14	2,375 ± 0,15**	1,21 ± 0,04*,###
Цитрулін, нмоль/мг білка	36 ± 3,7	123,3 ± 10***	26,8 ± 4,31###
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , пмоль/мг білка	170,4 ± 11,75	69,4 ± 18,09**	178 ± 13###
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , нмоль/мг білка	17,46 ± 1,99	30,16 ± 3,06**	13,65 ± 0,94###
Аргіназа, нмоль/мг білка	2,59 ± 0,305	2,57 ± 0,13	1,105 ± 0,069***,###
Сечовина, нмоль/мг білка	193,48 ± 28,03	101,3 ± 4,5**	52 ± 2,82***,###

радикала; а NO<sub>2</sub><sup>-</sup> знижувався у 2,5 рази, що також є показником гіпоксії серцевої тканини, оскільки його утворення з NO можливе лише у оксигенованих розчинах. Таким чином, високий вміст NO<sub>3</sub><sup>-</sup> свідчить про інтенсивне утворення і розпад пероксинітриту, вказуючи на розвиток нітрозативного окисного стресу в умовах нашого експерименту.

У досліджах із введенням геніпіну перед ішемією міокарда ми спостерігали значне зниження активності ферментів iNOS, аргінази та нітратредуктази (див. табл. 2). Водночас активність cNOS збільшилася вдвічі. Однак цього, очевидно, було не достатньо для відновлення діастолічної функції лівого шлуночка під час реперфузії, оскільки швидкість розслаблення міокарда була достовірно нижчою, ніж у контролі (див. рис. 1,а) і не відновлювалася до кінця спостереження. Це свідчить про нестачу оксиду азоту у тканинах серця в постішемичний період, а також перевантаження кардіоміоцитів кальцієм. Слід відзначити, що перфузія геніпіном уже на 5-й хвилині спостереження призводила до підвищення кінцево-діастолічного тиску (див. рис. 1,б), а також до достовірного зниження коронарного потоку та збільшення кисневої вартості роботи серця протягом всього часу перфузії геніпіном, що вказує на ускладнення розслаблення лівого шлуночка та, певним чином, на ендотеліальну дисфунк-

цію. Можливо, NO, синтезований iNOS, необхідний для гальмування проліферації фібробластів і синтезу констрикторних ейкозаноїдів, які масово утворюються при запальних процесах. Тому й не випадково ранній етап постішемичного відновлення скоротливої функції міокарда в наших експериментах супроводжувався надмірною контрактуєю лівого шлуночка та коронарних судин. Таким чином у клітині створюється дефіцит сигнальних молекул, які б запускали каскади програм захисту клітин в умовах гіпоксії.

Двоє дія геніпіну зумовлена, з одного боку, надмірним гальмуванням розвитку окисного стресу при ішемії–реперфузії серця старих щурів. Антиліпопероксидативна активність геніпіну спостерігалась у досліджах з гомогенатами мозку [20], де він пригнічував утворення малонового діальдегіду у відповідь на ПОЛ гідроксильним радикалом, генерованим системою Fe<sup>2+</sup>–аскорбат. У наших експериментах геніпін проявляв також антирадикальні властивості, а саме – знижував вміст як супероксидного радикала, так і гідроксильного і, як наслідок, – малонового діальдегіду.

Чому може відбуватись активація cNOS, яку ми спостерігали в наших експериментах? Відомо, що cNOS активується іонами Ca і фосфорилуванням протеїнкіназою Akt/PKB [12], що призводить до

збільшення продукції NO [23]. Тому серед можливих механізмів дії геніпіну є: активація сигнального шляху PI3K/Akt, де протеїнкіназа Akt/PKB здійснює фосфорилування cNOS і, таким чином, активує її або пригнічення протеїнкінази C; в обох випадках збільшується продукція NO cNOS. Серед усього різноманіття сигнальних шляхів у клітині є такий, що починається від мембранних рецепторів, чутливих до інсуліноподібних ростових факторів (relaxin/insulin-like family peptide receptor) [25], схематично поданий на рис. 2.

Другий аспект дії геніпіну полягає в «вимкненні» продукції de novo синтезу оксиду азоту iNOS у тканинах серця старих щурів. Імовірно, це відбувається через пригнічення її експресії. Механізм, який опосередковує цей процес (рис. 2), може полягати в запобіганні деградації протеїну

IκB-β – інгібіторної субодиниці ядерного фактора κB (NF-κB) [20], адже його ядерна локалізація залежить від деградації IκB-β. Якщо цей протеїн розпався, то NF-κB заходить в ядро і зв'язується з промоторною ділянкою гена iNOS, посилюючи його експресію [25] та продукцію NO. Деградація IκB-β відбувається внаслідок фосфорилування його протеїнкіназою A, яка активується таким вторинним месенджером як цАМФ. У свою чергу вміст цАМФ контролюється ферментом аденілатциклазою, яка підвищує його вміст, та фосфодіестеразою, котра метаболізує його і запобігає активації PKA. Ймовірно, дія геніпіну спрямована на пригнічення активності протеїнкінази A.

Таким чином, у наших експериментах геніпін, якому властива інсуліноподібна дія, продемонстрував регуляторний вплив на експресію iNOS та на активність cNOS.

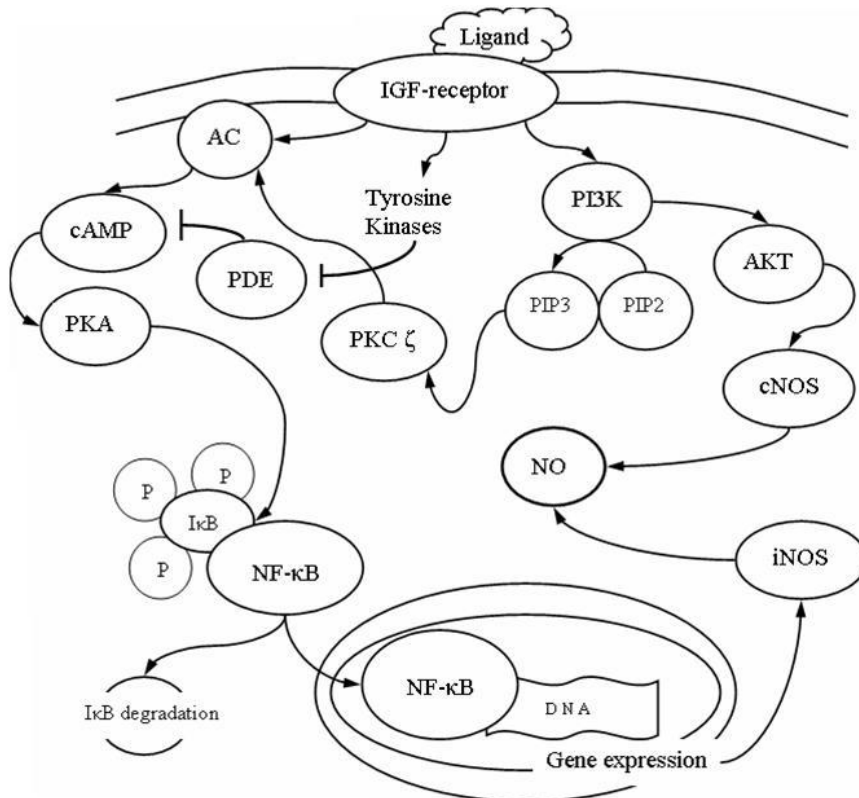


Рис. 2. Сигнальний шлях активації NO-синтаз через рецептори, чутливі до інсуліноподібних ростових факторів. Пояснення в тексті

## ВИСНОВКИ

1. Ішемія–реперфузія міокарда старих щурів супроводжувалася підвищенням швидкості утворення АФК ( $H_2O_2$ , супероксидного радикала,  $OH$ -радикала) і АФА (високий вміст  $NO_3^-$  свідчив про інтенсивне утворення і розпад пероксинітриту), що мала наслідком ініціацію ПОЛ.

2. Пригнічення активності UCP2 геніпіном у дозі  $10^{-5}$  моль/л супроводжувалося зниженням скоротливої активності міокарда і зростанням кінцево-діастолічного тиску та кисневої вартості роботи серця старих щурів. Перфузія геніпіном до ішемії збільшувала реперфузійні порушення функції серця старих щурів порівняно з контролем.

3. Геніпін має потужні антирадикальні та антиліпопероксидативні властивості, оскільки його попереднє введення призвело до значного зниження генерації АФА та запобігало активації ПОЛ у відповідь на ішемію–реперфузію серця старих щурів.

4. Можливий стимуляторний ефект геніпіну на активність cNOS полягає у активації PI3K/Akt.

5. Геніпін істотно знижував активність iNOS у тканинах серця старих щурів, імовірно, внаслідок пригнічення активації протеїнкінази А, що призвело до стабілізації комплексу I- $\kappa$ B–NF- $\kappa$ B і блокади експресії iNOS.

**Ю.В. Гошовская, Ю.П. Коркач,  
Т.В. Шиманская, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач**

### **ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ РАЗОБЩАЮЩИХ БЕЛКОВ НА СИСТЕМУ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА И РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ СЕРДЦА СТАРЫХ КРЫС**

На модели изолированного (по методу Лангендорфа) сердца старых крыс изучали влияние генипина, обладающего свойством угнетать UCP (от англ. uncoupling protein)-зависимый протонный поток через внутреннюю мембрану митохондрий, на систему оксида азота и развитие окислительного стресса, вызванного ишемией–реперфузией. Последняя сопровождалась увеличением в гомогенате сердца содержания супероксидного и гидроксильного радикалов, перекиси водорода, угнетением активности

конститутивной NO-синтазы (NOS), образованием пероксинитрита и развитием нитрозативного стресса. Перфузия изолированного сердца генипином в дозе  $10^{-5}$  моль/л в течение 15 мин до ишемии предотвращала образование свободных радикалов кислорода и окисление липидов мембран. Генипин стимулировал активность конститутивной NOS, однако ингибировал экспрессию индуцибельной NOS. Постишемическое восстановление показателей кардиодинамики было угнетено вследствие «выключения» продукции NO именно индуцибельной NOS, играющей ключевую роль в ранние периоды реперфузии. Пришли к выводу, что генипин является мощным антиоксидантом и демонстрирует инсулиноподобную активность, обусловленную его способностью влиять на продукцию NO на уровне внутриклеточных сигнальных каскадов.

Ключевые слова: ишемия–реперфузия, окислительный стресс, генипин, NO-синтаза, старение, белки-разобщители.

**Y.V. Goshovska, Y.P. Korkach, T.V. Shimanskaya,  
A.V. Kotsuruba, V.F. Sagach**

### **EFFECTS OF GENIPIN AT NO SYNTHESIS AND ISHEMIA/REPERFUSION INDUCED OXIDATIVE STRESS IN OLD RAT HEARTS**

Genipin is aglycone of geniposide, one of the active compounds of *Gardenia gasminoides* Ellis. The gardenia fruit extract has been used in traditional Chinese medicine to relieve the symptoms of type 2 diabetes that is accompanied with extensive oxidative stress and endothelial dysfunction of NO production. Besides, genipin was shown to inhibit UCP-dependent proton leak through the inner mitochondrial membrane that leads to increased membrane potential and ATP production. We studied the effects of genipin at ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and activity of NOS isozymes using Langendorf perfused old rat heart model. Ischemia/reperfusion is well-known oxidative agent, and showed significant increasing of superoxide radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. Genipin application in doze  $10^{-5}$  mol/L for 15 min before prolonged ischemia exerted powerful antiradical and antilipoperoxidative effects. Heart ischemia/reperfusion was supported with peroxynitrite generation and nitrozative stress. We demonstrated the inhibitory property of genipin on iNOS expression that possibly occurs via protein kinase A inhibition and stabilization of I- $\kappa$ B–NF- $\kappa$ B complex. Genipin stimulated cNOS activity seemingly activating PI3K/Akt signaling pathway. Although, post-ischemic recovery of cardiodynamic parameters of old rat hearts were depressed due to “switching off” the NO production by inducible NOS which is important in early period of reperfusion. Thus, we conclude that genipin is powerful antioxidant and posses insulin-like activity due to its property of managing the NO production at intracellular signal transduction cascade level.

Key words: ischemia-reperfusion, oxidative stress, genipin, nitric oxide synthase, aging, UCP.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, Ukraine*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В.А., Суткова Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и при патологии – К.: Наук. думка, 1997. – ч. 2. – С. 128–130.
2. Гошовська Ю.В., Лісовий О.О., Шиманська Т.В., Гагач В.Ф. Зміни експресії генів UCP2 та UCP3, функціонального стану і кисневої вартості роботи міокарда в умовах старіння та ішемії–реперфузії // Фізіол. журн. – **55**, № 3. – С. 26–36.
3. Коркач Ю.П., Рудик О.В., Коцюрuba А.В. та ін. Участь синтезу оксиду азоту та супероксид-аніона в механізмі протекторної дії екдистерону в мітохондріях серця щурів при стрептозотоніндукованому діабеті // Фізіол. журн. – 2007. – **53**, №5. – С.22–28.
4. Шугалей В.С., Козина А.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду // Физиол. журн. СССР. – 1977. – № 8. – С. 1199–1202.
5. Becker L.B., Vanden Hoek T.L., Shao Z-H. et al. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion // Amer. J. Physiol. – 1999. – **277**. – P. 2240–2246.
6. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research // J. Mol. Cell Cardiol. – 2001. – **33**. – P. 1897–1918.
7. Boyde T.R., Rahmatullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime // Anal. Biochem. – 1980. – **107**, № 2. – P. 424–431.
8. Brand M.D., Affouret C., Esteves T.C. et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins // Free Rad. Biol. Med. – 2004. – **37**. – P. 755–767.
9. Branford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248–254.
10. Cai H., Li Z., Dikalov S., Holland S.M. et al. NAD(P)H oxidase-derived hydrogen peroxide mediates endothelial nitric oxide production in response to angiotensin II // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, № 50. – P. 48311–48317.
11. Das D.K., Maulik N. Conversion of death signal into survival signal by redox signaling // Biochem. (Mosc). – 2000. – **69**, № 1. – P. 10–17.
12. Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation // Nature. – 1999. – **399**. – P. 601–605.
13. Echta K.S., Murphy M.P., Smith R.A. et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, № 49. – P. 47129–47135.
14. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, № 1. – P. 131–138.
15. Gutierrez J., Ballinger S.W., Darley-Usmar V.M., Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids. The emerging role in signal transduction in vascular cells // Circulat. Res. – 2006. – **99**. – P. 924–932.
16. Heger J., Godecke A., Fogel U. et al. Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction // Ibid. – 2002. – **90**. – P. 93–99.
17. Humphries K.M., Yoo Y., Szweda L.I. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal // Biochem. – 1998. – **37**, № 2. – P. 552–557.
18. Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/iodide system // Eur. J. Biochem. – 1984. – **141**, № 1. – P. 69–74.
19. Jones S.P., Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection // J. Mol. Cell Cardiol. – 2006. – **40**. – P. 16–23.
20. Koo H.J., Song Y.S., Kim H.J. et al. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia // Eur. J. Pharmacol. – 2004. – **495**. – P. 201–208.
21. Kuthan H., Ullrich V., Estabrook R.W. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems // Biochem. J. – 1982. – **203**, № 3. – P. 551–558.
22. Lesnefsky E.J., Hoppel C.L. Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria // Arch. Biochem. Biophys. – 2003. – **420**, № 2. – P. 287–297.
23. McCabe T.J., Fulton D., Roman L.J., Sessa W.C. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain “calcium-independent” eNOS activation by phosphorylation // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**. – P. 6123–6128.
24. Nair V., Cooper C.S., Vietti D.E., Turner G.A. The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde // Lipids. – 1986. – **21**. – P. 6–10.
25. Nistri S., Bani D. Relaxin receptors and nitric oxide synthases: search for the missing link // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2003. – **1**. – P.5.
26. Prendergast B.D., Sagach V.F., Shah A.M. Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart // Circulation. – 1997. – **96**, № 4. – P.1320–1329
27. Tsukahara H., Miura M., Tsuchida S. et al. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats // Amer. J. Physiol. – 1996. – **270**, № 5, Pt 1. – P. E840–E845.
28. Van den Hoek T.L., Becker L.B., Shao Z. et al. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**. – P. 18092–18098.
29. Vidal-Puig A.J., Grujic D., Zhang C.Y. et al. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, № 21. – P. 16258–16266.
30. West M.B., Rokosh G., Obal D. et al. Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase



- protects against ischemia/reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition // *Circulation*. – 2008. – **118**. – P. 1970–1978.
31. Zhang C.Y., Parton L.E., Ye C.P. et al. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets // *Cell Metab.* – 2006. – **3**, № 6. – P. 417–427.
32. Zhen J., Lu H., Wang X.Q. et al. Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species // *Amer. J. Hypertens.* – 2008. – **21**, № 1. – P. 28–34.

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

*Матеріал надійшов до редакції 01.07.2009*