

Ю.В. Гошовська, Т.В.Шиманська, О.В. Рудик, Ю.П. Коркач, В.Ф.Сагач

Проникність мітохондріальних мембран за умов ішемічного прекодиціювання

Феномен ішемічного прекодиціювання полягає у підвищенні стійкості міокарда до ішемічно-реперфузійних уражень. Механізми, які лежать в основі адаптації міокарда до ішемії, активно вивчаються, але достеменно відомо про відновлення при цьому енергопродукуючої функції мітохондрії. Метою роботи було з'ясування шляхів формування кардіопротекторного ефекту ішемічного прекодиціювання, що полягають в регуляції проникності мітохондріальних мембран і опосередковують адаптацію серця до ішемії. В експериментах на ізольованих серцях і суспензії мітохондрій щурів було показано, що ішемічне прекодиціювання у вигляді трьох 5-хвилинних епізодів зупинки перфузії запобігало надмірній продукції активних форм кисню при тривалій ішемії-реперфузії міокарда і сприяло більш повному відновленню функції серця щурів. При цьому спостерігали інгібування утворення мітохондріальних пор внаслідок посилення синтезу NO. Це підтверджувалося зменшенням вивільнення мітохондріального фактора у коронарне русло і зниженням чутливості ізольованих після тотальної ішемії серця мітохондрій до іонів кальцію. Зроблено висновок, що серед процесів, які беруть участь у формуванні кардіопротекторного ефекту ішемічного прекодиціювання, зменшення проникності мітохондріальних мембран внаслідок блокади утворення мітохондріальних пор вирішальну роль.

Ключові слова: серце, ішемічне прекодиціювання, оксид азоту, мітохондріальна пора

ВСТУП

В умовах недостатнього постачання міокарда киснем спостерігається пошкодження серця, пов'язане з активацією вільнорадикальних процесів, кальцієвим переважаттям, денатурацією білків, виснаженням запасів аденозинтрифосфату (АТФ) і глюкози, накопиченням токсичних метаболітів і зниженням клітинного рН [28]. Після коротких періодів ішемії функція серця відновлюється, однак при тривалій оклюзії пошкодження тканин стають незворотними, а реперфузія тільки погіршує ситуацію. Основними «винуватцями» реперфузійних порушень функції міокарда вважаються збільшена концентрація іонів кальцію в цитозолі клітин і посилена генерація активних форм кисню (АФК), кількість яких після відновлення коронар-

ного потоку зростає до вільнорадикального вибуху. У більшості випадків окисне пошкодження мітохондрій є пусковим механізмом апоптозу, першою ланкою якого є утворення неселективних каналів – мітохондріальних пор (МП) і вивільнення таких проапоптотичних факторів, як цитохром с тощо [7, 13, 28]. Встановлено, що реперфузійні порушення функції серця і коронарного кровообігу зумовлені саме відкриванням МП [6, 27]. З'ясування механізмів запобігання цьому при ішемії є важливими для розробки якісно нових підходів у сучасній клінічній практиці.

Фундаментальні дослідження показали, що метаболічна адаптація або так зване ішемічне прекодиціювання (ІП), коли при послідовному пред'явленні стресорних подразників відповідь на наступний може бути модифікована під впливом поперед-

© Ю.В. Гошовська, Т.В.Шиманська, О.В. Рудик, Ю.П. Коркач, В.Ф.Сагач

нього, є найбільш ефективним захистом клітин від ішемічного ушкодження [41]. Механізми, які лежать в основі адаптації міокарда до ішемії, активно вивчаються, але достеменно відомо, що мітохондрії відіграють при цьому найважливішу роль [17, 28, 30]. Повідомляється зокрема, що у мітохондріях, отриманих із сердець після ішемічного прекодиціювання, ефективно відновлюється синтез АТФ під час реоксигенації [44]. Існують декілька гіпотез, що пояснюють феномен адаптації до ішемії, але, як правило, кінцевою ланкою передачі сигналу вважається фосфорилування і активація АТФ-залежних калієвих каналів [24, 40]. Відкривання останніх зменшує вхід Ca^{2+} , що призводить до зниження скоротливої здатності кардіоміоцитів, зменшення споживання клітинами енергії та витрати АТФ [8]. При вивченні феномену ІП було показано також участь білка теплового шоку HSP70, який накопичується в серці при короткочасній ішемії і значно підвищує стійкість міокарда до подальшої тривалої оклюзії. Зроблений висновок, що активація HSP70 за допомогою стресових чинників лежить в основі адаптації міокарда до пошкоджень. Слід також відзначити можливість поєднання різних потенційних механізмів феномена прекодиціювання серця. Наприклад, HSP70 і HSP90 є основними структурними компонентами глюкокортикоїдного, стероїдного і прогестеронового рецепторів, завдяки чому беруть участь у генерації сигналу після взаємодії рецептора зі своїм лігандом. Крім того, HSP70 зв'язує рецептор кальцію кальмодулін і бере участь у регуляції транскрипції NO-синтази [9]. Раніше було показано, що ендогенний оксид азоту (NO) пригнічує утворення МП [10, 21, 46]. Незважаючи на значний прогрес у вивченні феномена ІП, механізми, що лежать в його основі, залишаються не до кінця зрозумілими.

Метою нашої роботи було з'ясування шляхів формування кардіопротекторного ефекту, що здійснюється при ІП і опосеред-

ковує адаптацію серця до ішемії, на фоні комплексної оцінки функціонального стану серця.

МЕТОДИКА

Експерименти виконували на дорослих самцях щурів лінії Вістар віком 6 міс, масою 300–350 г. з дотриманням вимог Європейської конвенції щодо роботи з експериментальними тваринами (Страсбург, 1986). Перфузію коронарних судин ізольованого серця здійснювали за методом Лангендорфа в умовах постійного тиску. Реєстрацію показників кардіодинаміки (тиск, що розвиває лівий шлуночок – ТЛШ; кінцево-діастолічний тиск – КДТ; коронарний потік; швидкість скорочення – dP/dt_{\max} і розслаблення – dP/dt_{\min} міокарда, частота серцевих скорочень – ЧСС) проводили як описано нами раніше [10]. Для розрахунку споживання кисню міокардом реєстрували напруження кисню у пробах перфузійного розчину, що притікав і відтікав від серця за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk-2 Radiometer («Elema», Швеція). Кисневу вартість роботи серця виражали як співвідношення споживання кисню до інтенсивності скоротливої функції серця (добуток ТЛШ і ЧСС).

Адаптацію до ішемії здійснювали за допомогою трьох сеансів тотальної 5-хвилинної ішемії, розділених 5 хв періодами реперфузії. Ішемію міокарда моделювали припиненням перфузії серця на 20 хв. Відновлення функції серця спостерігали протягом 40 хв реперфузії.

Вивільнення мітохондріального фактора, що є маркером відкривання МП [7, 42], визначали за підвищенням оптичної густини розчинів, що відтікали від серця. Оптичну густину проб вимірювали в ультрафіолетовому спектрі в діапазоні довжин хвиль 230–260 нм спектрофотометром СФ-46.

Після закінчення реєстрації функціональних характеристик серця промивали у 0,9%-му розчині KCl (2–4°C) і виділяли

мітохондрії за допомогою методу диференційного ультрацентрифугування [2]. Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі. Концентрація білка в пробі становила 0,4–0,5 мг/мл.

Дослідження відкриття МП проводили за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій. Проби останніх поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): КСІ – 120, тріс-НСІ – 25, KH_2PO_4 – 3, сукцинат натрію – 5; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і за допомогою спектрофотометра СФ-46 реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при $\lambda=520$ нм за 5 хв до і через 15 хв після їх набухання в інкубаційному середовищі за умов дії індуктора відкриття МП – Ca^{2+} (у кінцевій концентрації 10^{-4} моль/л) та інгібітора – циклоспорину А (у кінцевій концентрації 10^{-5} моль/л, «Fluka», Швеція) [16]. Як контроль використовували суспензію нативних мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора, оптичну густину якої реєстрували протягом 15 хв. Функціональну залежність набухання мітохондрій від часу обраховували за допомогою програми ORIGIN 6.0 («Microcall Inc.», США).

Для біохімічних досліджень серця негайно заморожували у рідкому азоті. Інтенсивність оксидативного метаболізму у гомогенатах серця щурів оцінювали за зміною швидкості генерації нестабільних вільних радикалів кисню – супероксидного аніон-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) [37], $\cdot\text{OH}$ -радикала [33], вмісту стабільного пероксиду водню (H_2O_2) [34] і кінцевого продукту перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) малонового діальдегіду [43].

Інтенсивність генерації NO оцінювали за утворенням цитруліну (активність індукбельної і конститутивної NOS), вмісту нітрит-аніона (NO_2^-) [26] і нітрат-аніона (NO_3^-) [47]. Інтенсивність реутилізаційної генерації NO – нітратредуктазну активність – визначали за змінами вмісту нітрат-

аніона в інкубаційному середовищі за наявності надлишку НАДН. Активність аргінази, яка є конкурентом NOS, оцінювали спектрофотометричним методом [11]. Цитрулін – продукт NOS і маркер генерації NO – визначали чутливим спектрометричним методом [14], а вміст сечовини – за допомогою добірки реактивів «Філіст-Діагностика» (Україна). Вказані біохімічні дослідження проводили: в контрольних умовах; після трьох ішемічних епізодів; після тривалої ішемії–реперфузії без і на фоні ІП.

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням програми MS Excell і виражали у вигляді середнього \pm стандартне відхилення. Застосовуючи критерій t Стьюдента, достовірними вважали зміни при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ішемічне прекодиціювання сприяло покращенню відновлення функції ізольованого серця після тривалої ішемії. Три короткі епізоди ішемії ізольованого серця – ІП певною мірою пригнічували функціональний стан серця: ТЛШ, dP/dt , ЧСС, а також коронарний потік мали тенденцію до зменшення на 15–20 % (таблиця). Біохімічні показники активності вільнорадикальних процесів не зазнавали істотних змін.

ІП ефективно запобігало розвитку важких реперфузійних порушень функції ізольованого серця і виникненню фібриляції з початком реперфузії, що яскраво демонструють криві зміни ТЛШ на рис. 1.

Кардіопротекторний ефект адаптації до ішемії проявлявся вже на 10-й хвилині реперфузійного періоду: ТЛШ відновлювався до $82,5 \% \pm 8,8 \%$ (рис. 2,а), коронарний потік – до $80 \% \pm 9,4 \%$, інтенсивність скоротливої функції серця становила $67,4 \% \pm 12 \%$. ІП істотно зменшувало розвиток контрактури міокарда: крутизна підйому КДТ під час ішемії була нижчою,

**Вплив ішемічного прекодицювання на показники кардіодинаміки і кисневого обміну ізольованого серця
($M \pm m, n = 8$)**

Показник	Ішемічне прекодицювання	
	до	після
Тиск, що розвиває лівий шлуночок, мм рт. ст.	140±7,9	117±8,5
Кінцево-діастолічний тиск, мм рт. ст.	-1,5±1,1	1,04±1,9
Швидкість скорочення міокарда, мм рт. ст./с	2360±168	1919±165
Швидкість розслаблення міокарда, мм рт. ст./с	-2005±150	-1631±152
Коронарний потік, мл · хв ⁻¹	13,1±1,1	11,7±1,1
Частота серцевих скорочень, хв ⁻¹	206±26	196±28
Споживання кисню, мм рт. ст. · мл	3278±398	2915±395
Інтенсивність скорочувальної функції, мм рт. ст. · хв ⁻¹	30102±4469	23703±4014
Киснева вартість роботи серця, мл · хв	0,119±0,013	0,138±0,016

ніж у контролі (рис. 2,б), а dP/dt_{min} у адаптованих сердець становила $78,7 \pm 5,8$ порівняно $28 \% \pm 6,7 \%$ у неадаптованих (рис. 2,в). Останній факт є яскравим підтвердженням кардіопротекторної дії ІП. Запобігання функціональних розладів серця супроводжується попередженням морфологічних змін міокарда: у літературі неодноразово повідомляється про зменшення

розміру зони інфаркту при застосуванні ІП [23, 24, 28, 31, 35].

Слід відмітити, що ІП оптимізувало кисневий метаболізм в ішемізованому серці: у початковий період реперфузії ми не спостерігали різкого збільшення споживання кисню ($78,2 \% \pm 11\%$), а киснева вартість роботи міокарда становила лише $111,6 \% \pm 12 \%$, тоді як у контрольній серії

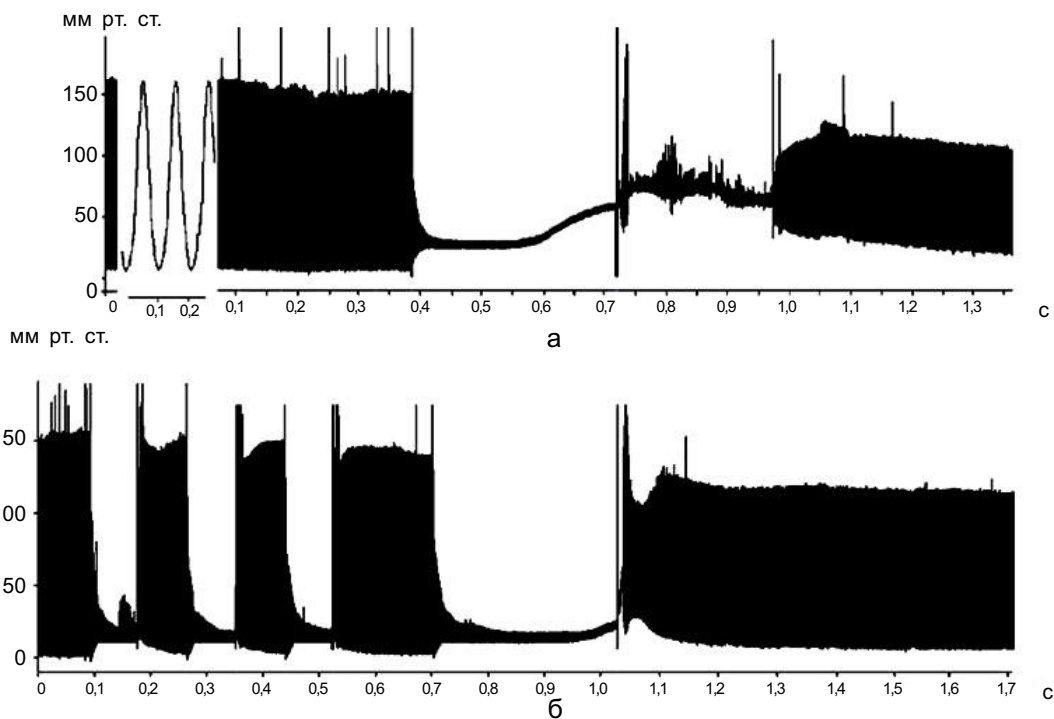


Рис. 1. Криві тиску, що розвиває лівий шлуночок при ішемії–реперфузії ізольованого серця щурів без (а) і на фоні попереднього ішемічного прекодицювання (б)

на 10-й хвилині реперфузії вона зростала більш ніж у 4 рази (див. рис. 2,г). Таким чином, ІП підвищувало ефективність роботи дихального ланцюга мітохондрій кардіоміоцитів і, відповідно, використання кисню міокардом.

Дані наших попередніх досліджень свідчили, що зменшення кисневої вартості роботи серця може бути результатом стимуляції синтезу оксиду азоту [4] або зниження продукції вільних радикалів. Для з'ясування механізму оптимізації кисневого обміну ми порівнювали інтенсивність генерації NO і ступінь розвитку окисного стресу при ішемії–реперфузії міокарда у щурів без і з ІП.

Ішемічне прекоондиціонування гальмувало розвиток окисного стресу при ішемії міо-

карда. Мітохондрії виступають одним з основних джерел утворення АФК за різних патологічних станів [18, 19, 39]. Це спостерігалось і в наших експериментах: тривала ішемія і наступна реперфузія міокарда супроводжувалися інтенсифікацією вільно-радикальних процесів (рис.3). Зниження активності сNOS під час ішемії–реперфузії на фоні трикратного підвищення активності аргінази, що конкурує з нею за спільний субстрат L-аргінін, свідчило про гальмування кальційзалежного синтезу NO, а збільшення у 5 разів активності нітратредуктази – про інтенсифікацію реутилізаційного синтезу оксиду азоту і розвиток гіпоксичного стану в серці. Найявність нітрозативного окисного стресу, наслідком якого були ініціація ПОЛ і порушення

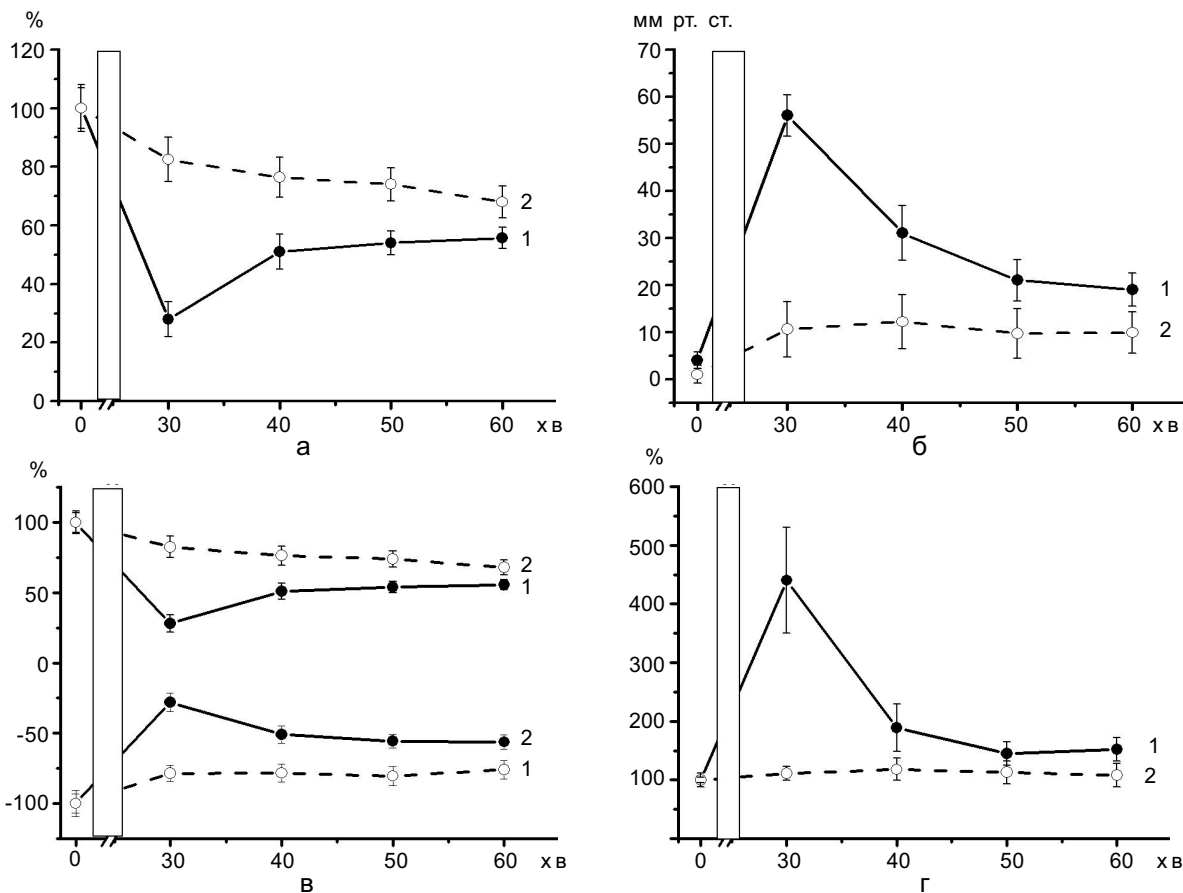


Рис. 2. Відновлення показників функціонального стану серця під час реперфузії без (1) і на фоні ішемічного прекоондиціонування (2): а – тиск у лівому шлуночку; б – кінцево-діастолічний тиск; в – швидкість скорочення і розслаблення міокарда; г – киснева вартість роботи серця

проникності мембран, підтверджувалося істотним підвищенням вмісту NO_3^- . Отже, розвиток окисного стресу після тривалої ішемії-реперфузії супроводжувався пригніченням синтезу NO в тканинах серця шурів.

ІІ значною мірою нівелювало розвиток окисного стресу при тривалій ішемії-реперфузії серця: зменшувався ступінь утворення вільних радикалів (див. рис. 3), активність sNOS відновлювалася до контрольних значень (рис. 4) на фоні невеликого, порівняно з контролем, підвищення вмісту NO_3^- (на $40\% \pm 12\%$). Виникає питання про активацію можливих шляхів клітинного обміну для запобігання розвитку окисного стресу.

Ми встановили цікавий факт, що після трьох циклів короткотривалих ішемій у клітинній фракції гомогенатів серця зростає активність NOS за рахунок iNOS з $5,4 \pm 1,6$ до $8,5$ $\text{пмоль/хв} \cdot \text{мг білка} \pm 1,0$ $\text{пмоль/хв} \cdot \text{мг білка}$ (рис. 5), що може свідчити на користь протекторної ролі iNOS у разі дисфункції sNOS . Ці результати узгоджуються з даними інших дослідників [1, 36], як і зі свідченнями про захисну роль

активації iNOS у пізній реперфузійний період [12, 32, 49]. Ймовірно, короткотривалих періодів ішемії і реперфузії цілком достатньо для легкої активації iNOS , яка бере на себе роль «швидкої допомоги» постачальника оксиду азоту. Таким чином, одним із шляхів адаптації до ішемії є посилення утворення оксиду азоту внаслідок активації iNOS .

Тонкий баланс між функціонуванням АФК як сигнальних молекул і токсичними ефектами, індукованими надлишковою кількістю кисневих радикалів, має велике значення в регуляції фізіологічних процесів клітини. Повідомляється, що АФК є одними з медіаторів ІІ [3, 48]: короткі ішемічні епізоди стимулюють збільшення фонового їх рівня, що «готує» серце до наступної тривалої оклюзії і, як наслідок, ранній реперфузійний період проходить зі значно меншими морфологічними та функціональними пошкодженнями міокарда. Серед можливих механізмів протекторної дії АФК – активація протеїнкінази C [25], транскрипційних факторів AP-1 та $\text{NF-}\kappa\text{B}$ і експресії низки протекторних генів, а також iNOS [45]. Можливо, АФК викликають процес так

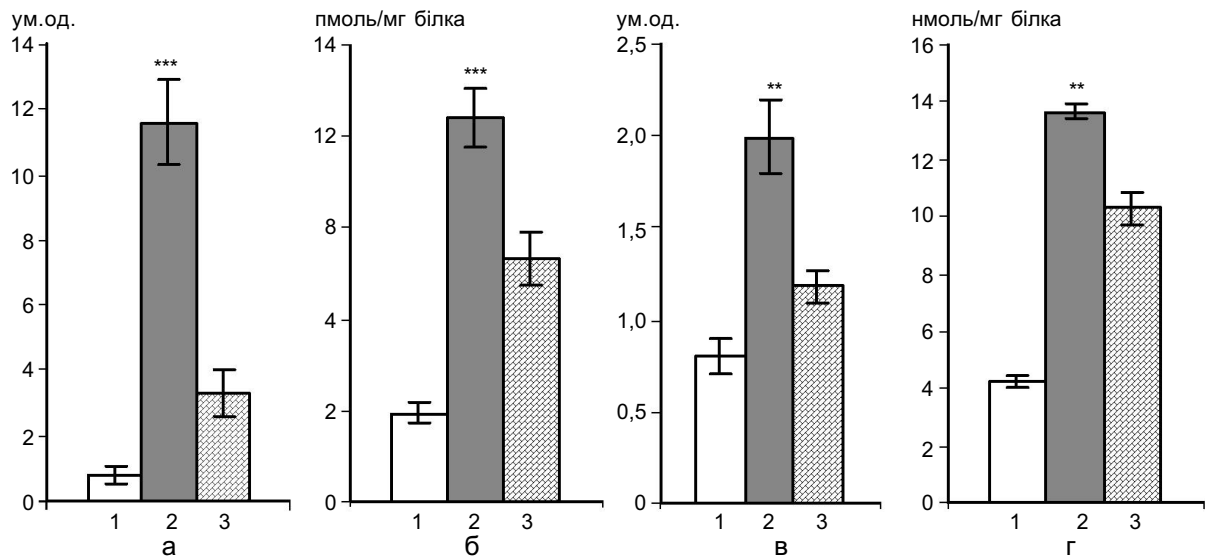


Рис. 3. Протекторний вплив ішемічного прекоондиціонування на розвиток окисного стресу при ішемії-реперфузії серця: а – O_2^- , б – H_2O_2 , в – $\text{OH}\cdot$, г – малоновий діальдегід у контролі (1), ішемії-реперфузії без (2) і на фоні ішемічного прекоондиціонування (3). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ відносно контролю

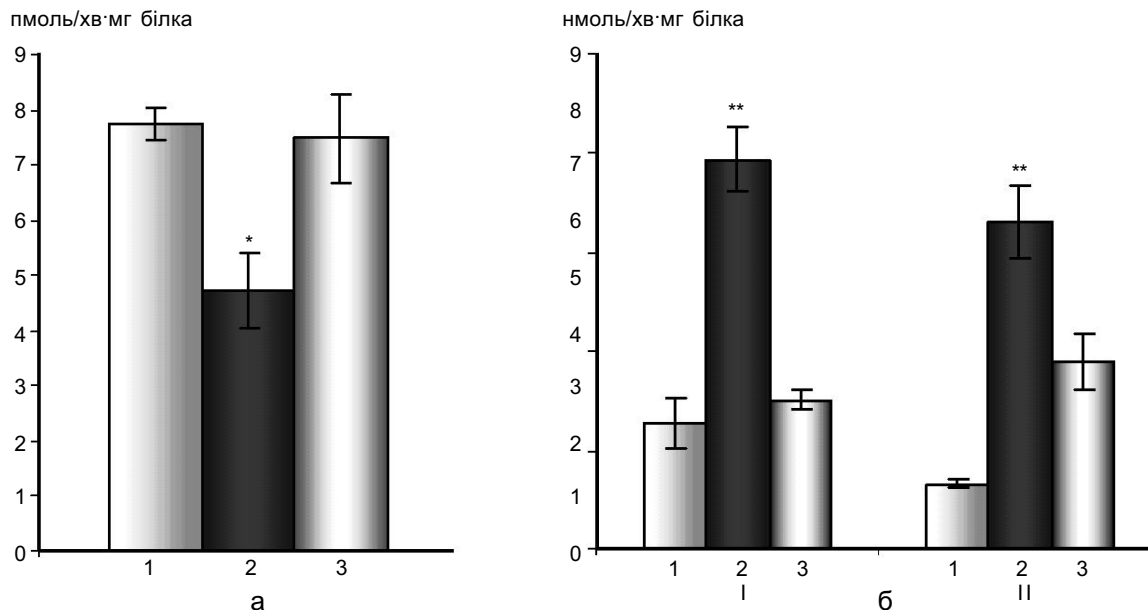


Рис. 4. Активність конститутивної NOS (а), аргінази (I) і нітратредуктази (II) (б) в контролі (1), при реперфузії серця без (2) і на фоні ішемічного прекодиціювання (3). * P<0,05, ** P<0,01 відносно контролю

званого «м'якого» роз'єднання мітохондрій, що сьогодні визнається дослідниками як універсальний механізм стимуляції продукції АТФ. При цьому активується протон-провідна функція роз'єднувальних білків, що запобігає надмірній продукції АФК дихальним ланцюгом при патологічних станах [15, 22] і, відповідно, утворенню МП [29].

Таким чином, ІП активує механізми, які пригнічують ініціацію вільнорадикальних процесів у міокарді в умовах тривалої ішемії. Одним з них є „легка” активація іNOS під впливом АФК.

Ішемічне прекодиціювання зменшувало ступінь порушення проникності мітохондріальних мембран під дією ішемії. Відомо, що потужний окисний стрес активує процес утворення МП [38], призводить до розвитку апоптозу кардіоміоцитів і пригніченню функціонального стану серця. Реперфузійні порушення функції серця пов'язані саме зі зміною проникності мітохондріальних мембран кардіоміоцитів внаслідок утворення МП неспецифічної провідності [7, 20]. Маркером утворення останнього може виступати виявлений

нами мітохондріальний фактор [5, 7, 42], наявність якого характеризується збільшенням оптичної густини відтікаючого від серця розчину при дослідженні його в ультрафіолетовій ділянці спектра при $\lambda=230-260$ нм. Результати спектрофотометричного аналізу свідчили, що проби відтікаючого від серця розчину, зібрані за першу хвилину реперфузії у групі щурів, яким

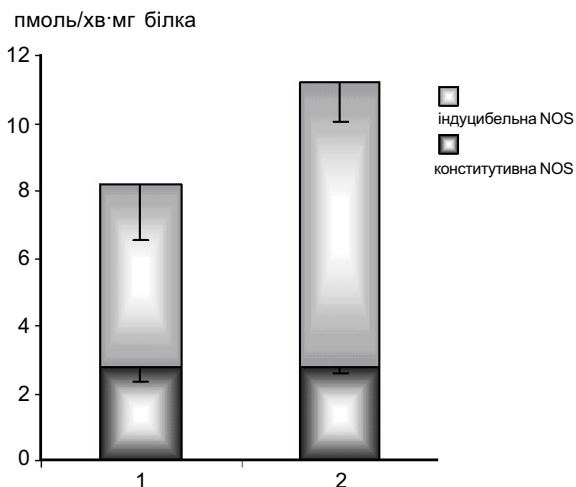


Рис. 5. Співвідношення активності NO-синтаз у вихідному стані (1) і після циклів ішемії–реперфузії (2)

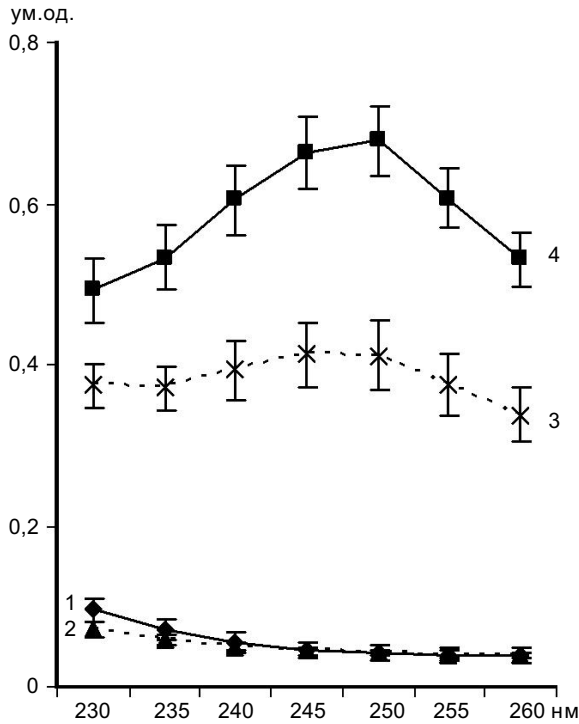


Рис. 6. Зміни оптичної густини розчину, що відтікав від ізольованого серця щурів перед ішемією (1, 2) і за першу хвилину реперфузії без (4) і при моделюванні ішемічного прекоондиціонування (3)

попередньо проводили ІП, характеризувалися не тільки достовірно меншим приростом оптичної густини розчину – 0,369 ум.од. \pm 0,045 ум.од. порівняно з контрольними тваринами без ІП – 0,638 ум.од.

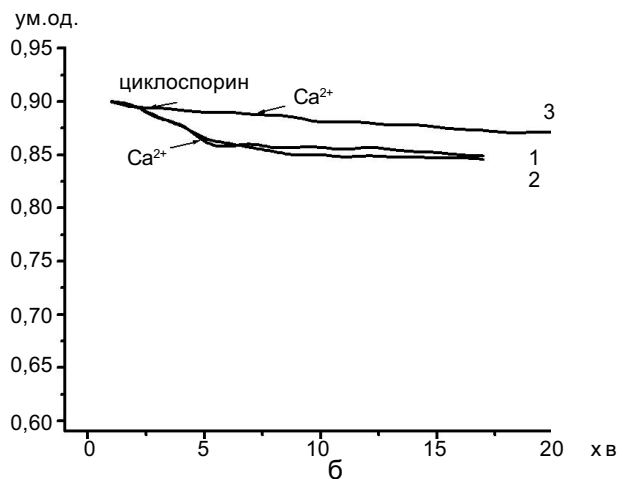
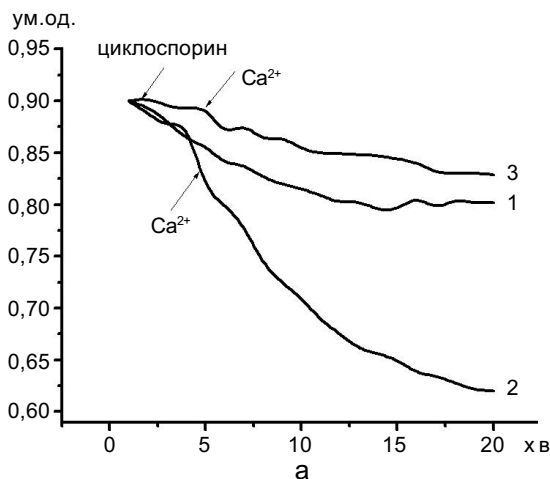


Рис. 7. Нативні криві кальційіндукованого набухання мітохондрій ішемізованого серця щурів без (а) і після ішемічного прекоондиціонування (б): 1 – контроль; 2 – Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 3 – циклоспорин А (10^{-5} моль/л) і Ca^{2+} (10^{-4} моль/л)

\pm 0,039 ум.од. ($P < 0,001$), але й відсутністю вивільнення маркера утворення МП (рис. 6). Отже, ІП призводить до зменшення порушень проникності мітохондріальних мембран. Таким чином, один зі шляхів кардіопротекторного ефекту ІП реалізується через механізм блокади утворення МП. Цей висновок перевіряли в експериментах з кальційіндукованим набуханням мітохондрій ішемізованого серця.

Ішемічне прекоондиціонування попереджало кальційіндуковане набухання мітохондрій ішемізованого серця. Відомо, що набухання мітохондрій кардіоміоцитів, яке спостерігається при реперфузії серця, призводить до роз'єднання окисного фосфорилування, порушення синтезу АТФ, збільшення проникності мітохондріальних мембран і ініціації апоптозу. Під час експериментів досліджували чутливість мітохондрій до Ca^{2+} – класичного активатора МП. Ступінь набухання мітохондрій, виділених з сердець після тривалої ішемії-реперфузії, під дією Ca^{2+} у концентрації 10^{-4} моль/л був значно вищим (див. рис. 7,а, крива 2), ніж у інтактних мітохондрій (див. рис. 7,а, крива 1). Активація МП вдало блокувалася класичним їх інгібітором циклоспорином А (див. рис. 7,а, крива 3), що підтверджувало МП-залежну динаміку досліджуваного

процесу. Під впливом Ca^{2+} набухання мітохондрій, виділених з ішемізованих сердець після моделювання ІП, мало характер, аналогічний такому у інтактних мітохондрій внаслідок перебування їх в ізотонічному розчині середовища інкубації (див. рис. 7,б). Отже, курс ІП призводив до підвищення резистентності мітохондрій серця до Ca^{2+} , який викликає МП-залежне набухання мітохондрій. Таким чином, один із шляхів захисного ефекту ІП включає зменшення чутливості мітохондрій міокарда до дії активаторів відкриття МП.

Нині багато досліджень присвячено вивченню внутрішньоклітинних захисних сигнальних механізмів, що активуються ІП. Факторами, які вивільнюються під час коротких періодів ішемії і діють через відповідні рецептори – аденозин, брадикінін, норадреналін, ендорфіни – активується протеїназа С [35]. АФК, які виділяються в «проміжних» реперфузіях, також задіяні в процесах активації протеїнази С і експресії певних «протекторних» генів. Оскільки інгібітори останньої та скевенджери вільних радикалів «знімають» ефект прекодиціювання, а агоністи аденозину посилюють його, то роль протеїнази С у процесі прекодиціювання очевидна і беззаперечна. Однак залишається до кінця не зрозумілим питання, яким саме чином ІП «захищає» мітохондрії і серце від пошкоджуючої дії ішемії?

Результати наших комплексних експериментів свідчать, що захисний вплив ІП значною мірою зумовлений пригніченням утворення МП. При моделюванні прекодиціювання спостерігали блокаду МП на рівні ізольованого серця: вивільнення речовин з ішемізованого серця істотно зменшувалося. Це підтверджувалося зниженою чутливістю мітохондрій, отриманих з прекодиційованих сердець, до природного індуктора відкриття пор – іонів кальцію, тобто тривала ішемія практично не викликала відкриття МП в адаптованих до

ішемії серцях. Безперечно, попередження вільнорадикального вибуху при реперфузії міокарда після ІП запобігало функціональним порушенням серця, а індукція синтезу оксиду азоту iNOS при короткочасних ішемічних епізодах могла виступати одним із протекторних механізмів адаптації серця до тривалої ішемії.

Базуючись на результатах наших досліджень, ми вважаємо, що серед процесів, які беруть участь у формуванні кардіопротекторного ефекту ІП, зменшення проникності мітохондріальних мембран внаслідок блокади утворення МП оксидом азоту відіграє вирішальну роль.

ВИСНОВКИ

1. ІП запобігало розвитку потужного окисного стресу, який зазвичай виникає при ішемії–реперфузії міокарда, збільшенню чутливості мітохондрій ішемізованого серця до кальційіндукованого набухання і сприяло більш істотному відновленню функції ізольованого серця щурів після тотальної ішемії, що яскраво проявлялося вже на ранніх етапах реперфузії.

2. Кардіопротекторний вплив ІП значною мірою був зумовлений пригніченням утворення МП, що підтверджувалося зменшенням вивільнення мітохондріального фактора у коронарне русло після тривалої ішемії.

3. Серед протекторних механізмів, що активуються ІП і, які дають змогу серцю швидше адаптуватися до тривалого ішемічного епізоду, є збільшення синтезу оксиду азоту внаслідок посилення активності iNOS.

**Ю.В. Гошовская, Т. В. Шиманская,
Е.В. Рудык, Ю.П. Коркач, В. Ф. Сагач**

ПРОНИЦАЕМОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН В УСЛОВИЯХ ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

Феномен ишемического прекодиционирования заключается в повышении устойчивости миокарда к репер-

фузионним поражениям. Механизмы, лежащие в основе адаптации миокарда к ишемии, активно изучаются, но доподлинно известно, что важнейшую роль при этом играют митохондрии. Целью работы было выяснение NO-зависимых путей формирования кардиопротекторного эффекта, который имеет место при ишемическом preconditionировании и опосредует адаптацию сердца к ишемии. В экспериментах на изолированных сердцах крыс и суспензии изолированных митохондрий сердца было показано, что ишемическое preconditionирование в виде трех 5-минутных эпизодов остановки перфузии сердца предотвращало развитие мощного окислительного стресса после длительной ишемии–реперфузии миокарда и способствовало более полному восстановлению функции изолированного сердца крыс. При этом ингибировался процесс образования митохондриальных пор вследствие усиления синтеза NO, что подтверждалось уменьшением высвобождения митохондриального фактора в коронарное русло и снижением чувствительности изолированных после тотальной ишемии митохондрий к действию ионов кальция. Сделан вывод, что среди процессов, участвующих в формировании кардиопротекторного эффекта ишемического preconditionирования, уменьшение проницаемости митохондриальных мембран вследствие блокады образования митохондриальных пор играет решающую роль.

Ключевые слова: изолированное сердце, ишемическое preconditionирование, оксид азота, митохондриальная пора.

Y.V. Goshovska, T.V. Shimanskaya, O.M. Rudyk, Y.P. Korkach, V.F. Sagach

MITOCHONDRIA PERMEABILITY TRANSITION AS A TARGET FOR ISCHEMIC PRECONDITIONING

The ischemic preconditioning (IPC) limits myocardial injury provoked by a subsequent prolonged ischemia-reperfusion (I/R). The underlying mechanisms of enhanced resistance of heart are actively studied, but for sure it was established that mitochondria play a major role in IPC-stimulated adaptation to ischemia. In this article we present and discuss evidences that cardioprotective effect of IPC is mediated by inhibition of mitochondria permeability transition pore (MPTP) opening. It was shown that IPC effectively prevents the excessive production of ROS by mitochondria during I/R and promotes a more complete restoration of function of isolated rat hearts. It was revealed that MPTP formation due to I/R was inhibited in IPC heart. Mitochondrial factor, the marker of MPTP opening found in outflow probes, was released in much lesser amounts in IPC hearts than in non-IPC. Furthermore, mitochondria isolated from IPC hearts showed a decreased sensitivity to calcium ions, a MPTP inductor, and, thus, massive MPTP-dependent swelling of mitochondria was abrogated in IPC hearts. In our experiments we observed slight increase in

inducible NOS activity right after short ischemic stimuli. We suppose that increased NO production by iNOS is involved in inhibition of MPTP and this may be one of the possible mechanisms of decreased sensitivity of mitochondria to calcium ions. It is concluded that among the processes involved in formation of cardioprotective effect of IPC, a reduction of membrane permeability due to the inhibition of MPTP opening plays a crucial role.

Key words: isolated heart, ischemic precondition, nitric oxide, iNOS, MPTP

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гарматина О.Ю., Ткаченко М.Н., Мойбенко А.А. Индуцибельная синтеза оксида азота при патологии сердца // Журн. АМН України. – 2005. – 11, № 4. – С. 645–659.
2. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия // Биохимия. – 1985. – 50, №8. – С. 1350–1361.
3. Петрищев Н.Н., Шляхто В.Е., Цырлин Е.А. Роль свободных радикалов кислорода в механизмах локального и дистантного ишемического preconditionирования миокарда // Вестник Рос. акад. мед. наук. – 2006. – №8. – С. 10–15.
4. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Вивчення ролі оксиду азоту у змінах споживання кисню та кисневої вартості роботи серцевого м'яза // Фізіол. журн. – 2000. – 46, №2. – С.33–38.
5. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Рудик О.В., Струтинська Н.А. Вивільнення неідентифікованих речовин мітохондріального походження – показник відкриття мітохондріальної пори серця шурів // Там само. – 2003. – 49, №5. – С. 3–12.
6. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Попередження постреперфузійних порушень функції серця та неефективного використання кисню за допомогою інгібіторів мітохондріальної пори // Там само. – 2002. – 48, №6. – С. 3–9.
7. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // Там само. – 2003. – 49, №4. – С. 6–12.
8. Шабалин А.В. Никитин Ю.П. Защита кардиомиоцита. Современное состояние и перспективы // Кардиология. – 1999. – №3. – С. 4–10.
9. Шевченко Ю.Л., Карпищенко А.И., Белевитин А.Б., Свистов А.С., Демидов О.Н., Тыренко В.В. Аутоиндуцированная толерантность миокарда к ишемии: роль стресс-белков в механизмах ее возникновения // Физиология человека. – 1999. – 25, № 1. – С. 134–139.

10. Шиманская Т.В., Добровольский Ф.В., Вавилова Г.Л., Струтинская Н.А., Рудык Е.В., Сагач В.Ф. NO-зависимая модуляция чувствительности открытия митохондриальной поры при ишемии/реперфузии изолированного сердца // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2009. – **95**, №1. – С. 28–37.
11. 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.
12. 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.
13. Borutaite V., Morkuniene R., Brown G.C. Release of cytochrome c from heart mitochondria is induced by high Ca²⁺ and peroxynitrite and is responsible for Ca(2+)-induced inhibition of substrate oxidation // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – **1453**, №1. – P. 41–48.
14. 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.
15. Brand M.D., Buckingham J.A., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Murphy M.P., Pakay J.L., Talbot D.A., Echtay K.S. Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production // Biochem. Soc. Symp. – 2004. – **71**. – P. 203–213.
16. Brookes P.S., Salinas E.P., Darley-Usmar K., Eiserich J.P., Freeman B.A., Darley-Usmar V.M., Anderson P.G. Concentration-dependent effect of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome C release // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, №27. – P. 20474–20479.
17. Burwell L.S., Brookes P.S. Mitochondria as a target for the cardioprotective effects of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury // Antioxid. Redox Signal. – 2008. – **10**, №3. – P. 579–599.
18. Chen Q., Hoppel C. L. Ischemia reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria // Arch. Biochem. Biophys. – 2003. – **420**. – P. 287–297.
19. Choksi K. B., Papaconstantinou J. Age-related alterations in oxidatively damaged proteins of mouse heart mitochondrial electron transport chain complexes // Free Rad. Biol. Med. – 2008. – **44**. – P. 1795–1805.
20. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // Biochem. J. – 1999. – **341**. – P. 233–249.
21. Dedkova EN, Blatter LA. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase // J. Physiol. – 2009. – **587**. – №4. – 851–872.
22. Echtay K.S., Roussel D., St-Pierre J., Morrison A., Pickering S., Clapham J.C., Brand M.D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein // Nature. – 2002. – **415**. – P. 96–99.
23. Fisher S. G., Marber M. S. An in vivo model of ischemia-reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the mouse heart // J. Pharmacol. Toxicol. Methods – 2002. – **48**. – P. 161–169.
24. Garlid K.D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V., Murray H.N., Darbenzio R.B., D'Alonzo A.J., Lodge N.J., Smith M.A., Grover G.J. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanisms of cardioprotection // Circ. Res. – 1997, № 81. – P. 1072–1082.
25. Gopalakrishna R, Anderson WB. Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1989. – **86**. – P. 6758–6762.
26. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, № 1. – P. 131–138.
27. Griffiths E., Halestrap A. Mitochondrial non specific pores remain closed during cardiac ischaemia but open upon reperfusion // Biochem. J. – 1995. – **307**. – P. 93–98.
28. Halestrap A., Clarke S.J., Javadov S.A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection // Cardiovasc. Res. – 2004. – **61**. – P. 372–385.
29. Halestrap A.P., Clarke S.J., Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – **1767**, № 8. – P. 1007–1031.
30. Han H.G., Wang Z.W., Zhang N.B., Zhu H.Y. Role of nitric oxide during early phase myocardial ischemic preconditioning in rats // Chin. Med. J. (Engl). – 2008. – **121**, №13. – P. 1210–1214.
31. Hausenloy D.J., Maddock H. L., Baxter G.F., Yellon D.M. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? // Cardiovasc. Res. – 2002. – **55**. – P. 534–543.
32. Heger J., Gudecke A., Flugel U., Merx M.W., Molojavyi A., Kohn-Velten W.N., Schrader J. Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction // Circ. Res. – 2002. – **90**. – P. 93–99.
33. 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.
34. Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system // Eur. J. Biochem. – 1984. – **141**. – №1. – P. 69–74.
35. Javadov S. A., Clarke S., Das M., Griffiths E.J., Lim K.H.H., Halestrap A.P. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart // J. Physiol. – 2003. – **549**. – P. 513–524.
36. Kanno S., Lee P., Zhang Y., Ho C., Griffith B.P., Shears L.L. 2nd, Billiar T.R. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase // Circulation. – 2000. –

101. – P. 2742–2748.
37. 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.
38. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death // *Physiol.Rev.* – 2007. – **87**. – P. 99–163.
39. Lesnefsky E.J., Gudiz T.I., Migita C.T., Ikeda-Saito M., Hassan M.O., Turkaly P.J., Hoppel C.L. Ischemic injury to mitochondrial electron transport in the aging heart: damage to the iron-sulfur protein subunit of electron transport complex III // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2001. – **385**. – №1. – P. 117–128.
40. Liu Y., Sato T., O'Rourke B., Marban E. Mitochondrial ATP dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection // *Circulation.* – 1998. – № 97. – P. 2463–2469.
41. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // *Ibid.* – 1986. – **74**. – P. 1124–1136.
42. Nadtochiy S.M., Nauduri D., Shimanskaya T.V., Sagach V.F., Brookes P.S. Purine release: a protective signaling mechanism of the mitochondrial permeability transition pore in ischemia // *Фізіол. журн.* – 2008. – **54**, №6. – С. 5–14.
43. 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.
44. Oshima Y., Fujio Y., Nakanishi T., Itoh N., Yamamoto Y., Negoro S., Tanaka K., Kishimoto T., Kawase I., Azuma J. STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart // *Cardiovasc. Res.* – 2005. – **65**. – P. 428–435.
45. Pinkus R., Weiner L.M., Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**. – P. 13422–13429.
46. Shimanskaya T.V. Goshovska Y., Sagach V. The role of mitochondrial permeability transition pore in modulation of oxygen cost of myocardial work by endogenous NO // *Adv. Biomed. Res. (Cambridge).* – 2010. – P.313–317.
47. Tsukahara H., Miura M., Tsuchida S., Hata I., Hata K., Yamamoto K., Ishii Y., Muramatsu I., Sudo M. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats // *Amer. J. Physiol.* – 1996. – **270**. – № 5, Pt 1. – P. E840–E845.
48. Van den Hoek T.L., Becker L.B., Shao Z., Li C., Schumacker P.T. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**. – P. 18092–18098.
49. West M.B., Rokosh G., Obal D., Velayutham M., Xuan Yu-Ting, Hill B., Keith R., Schrader J., Guo Y., Conklin D., Prabhu S., Zweier J., Bolli R., Bhatnagar A. 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.

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

Матеріал надійшов до
редакції 21.02.2011