

О.В. Аكوпова, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюруба, Л.І. Колчинська, В.Ф. Сагач

Метаболізм активних форм азоту та кисню в мітохондріях міокарда щурів за умов введення донора оксиду азоту

*Проаналізовано особливості метаболізму активних форм азоту та кисню (АФА й АФК відповідно) в мітохондріях міокарда щурів за умов введення різних доз нітрогліцерину (НГ). Показано, що введення НГ дозозалежно збільшує кальцієву ємність мітохондрій, внаслідок інгібування мітохондріальної пори (МП) *in vivo*, яке корелює з активацією мітохондріальної кальційзалежної ізоформи NO-синтази. Зі збільшенням дози НГ активність NO-синтази підвищується відповідно до збільшення кальцієвої ємності мітохондрій. Спостерігається також дозозалежна активація нітратредуктази, проте кількість утворюваного нітрит-аніона (NO_2^-) зменшується, що відповідає зміні співвідношення $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ в бік NO_3^- , кінцевого продукту перетворень NO. Співвідношення між нітрозилюванням мітохондріальних білків з утворенням нітрозотіолів і виходом NO_3^- також змінюється на користь останнього, що свідчить про посилення окисних процесів у мітохондріях міокарда після введення НГ. Показано дозозалежне збільшення продуктів перекисного окиснення ліпідів, маркера оксидативних ушкоджень мітохондріальних мембран. Встановлено, що підґрунтям оксидативного стресу є зростання продукції АФК (гідроксил-радикала та мітохондріального пулу H_2O_2), а також збільшення вмісту вільного заліза, джерелом якого може бути окисна деградація мітохондріальних залізовмісних білків. Взаємодія заліза з гідропероксидом за реакцією Фентона з утворенням гідроксил-радикала та вільнорадикальний розпад пероксинітриту, джерелом якого є NO_3^- , є вірогідною причиною багаторазового посилення продукції АФК, підвищення перекисного окиснення ліпідів та окиснення пулів NO. Блокування МП оксидом азоту, в тому числі й синтезованим в мітохондріях *in vivo*, активує обидві ланки циклу NO – NO-синтазної внаслідок кальційзалежної активації мітохондріальної NO-синтази та нітратредуктазної – внаслідок збільшення пулів NO_3^- . Зростання продукції АФК, яке багаторазово посилюється через вивільнення заліза, призводить до оксидативного стресу мітохондрій та зсуву метаболізму АФА в бік утворення NO_3^- – кінцевого продукту перетворень оксиду азоту, попри активацію нітратредуктазної ланки циклу NO. Показано, що відкриття МП за умов *in vitro* також зменшує продукцію АФК, тоді як її блокування циклоспорином А відновлює утворення АФК до контрольних значень. Одержані результати свідчать, що МП, відкриття якої попереджає гіперпродукцію АФК за умов *in vitro* та *in vivo*, є важливою ланкою регуляції метаболізму АФК і АФА в мітохондріях.*

Ключові слова: активні форми азоту та кисню, нітрогліцерин, кальцій, мітохондріальна пора, мітохондрії міокарда.

ВСТУП

Доведено, що оксид азоту (NO) є одним із універсальних регуляторів фізіологічних функцій організму з надзвичайно широким спектром фізіологічної дії. Зміни експресії

різних ізоформ NO-синтази (NOS), нестача або гіперпродукція NO, які відмічаються за патологічних станів, призводять до значного дисбалансу вмісту активних форм азоту та кисню (АФА і АФК) в організмі і, відповідно, – до порушення NO-залежних

механізмів регуляції кровообігу та роботи серця [24].

Найбільш детально дослідженим є механізм вазодилататорної дії NO, що здійснюється як цГМФ-залежним шляхом [24], так і безпосередньо за допомогою модуляції окисно-відновного стану клітинних тіолів [5], у тому числі й тих, що входять до складу активних центрів або регуляторних сайтів іонних каналів і ферментів, що відіграють важливу роль у регуляції тонуусу судин. Відомо, що цГМФ-залежний механізм вазодилататорного ефекту NO ґрунтується на зниженні вмісту цитозольного Ca^{2+} за допомогою відповідної дії на кальційтранспортні системи клітини: кальцієві канали плазматичної мембрани, Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматичного ретикулула [7], і навіть, як нещодавно показано нами, Na^+ , K^+ -АТФазу аорти [2], активація якої, як відомо, призводить до гіперполяризації клітин, блокує вхід Ca^{2+} через потенціалзалежні кальцієві канали та підтримує роботу Na^+ - Ca^{2+} -обмінника у прямому напрямі – видалення Ca^{2+} в обмін на вхід іонів Na^+ [13]. Відносно менш дослідженою залишається мітохондріальна кальційтранспортна система як мішень дії NO, яка виконує важливі фізіологічні функції, одна з яких – регуляція кальцієвого гомеостазу клітини та мітохондрій зокрема. Так, відомо, що вміст цитозольного Ca^{2+} значною мірою залежить від кальцієвої ємності мітохондрій та їх здатності до накопичення Ca^{2+} . Мітохондріальна система трансмембранного обміну Ca^{2+} включає Ca^{2+} -уніпортер, мітохондріальні Ca^{2+} - H^+ - та Na^+ - Ca^{2+} -обмінники, ріанодинові рецептори, а також мітохондріальну пору (МП), відкриття якої за умов надлишкового входу Ca^{2+} підвищує цитозольний вміст Ca^{2+} , посилює мітохондріальну деполяризацію, роз'єднує дихальний ланцюг, зменшує продукцію аденозинтрифосфату (АТФ), призводить до набухання матриксу й вивільнення цитохрому *c*, наслідком чого є індукція клітинного апоптозу й численних патологічних станів організму [7, 16, 30].

За умов фізіологічної норми кальційтранспортна система мітохондрій виконує низку регуляторних функцій щодо енергетичного стану мітохондрій, серед яких активація мітохондріальних дегідрогеназ, споживання кисню [18], системи окисного фосфорилування та синтезу АТФ [16]. Кальційзалежною є також мітохондріальна ізоформа NOS (мітоNOS) і, таким чином, мітохондріальний гомеостаз Ca^{2+} є модулятором активності мітоNOS та мітохондріального синтезу NO [8, 14]. Відомо, що NO – продукт окисного перетворення L-аргініну конститутивними та неконститутивною ізоформами NOS, надалі зазнає окисно-відновних перетворень ферментативним і неферментативним шляхом, з наступним відновленням NO [8]. Основними ланками циклу перетворень NO є нітрозилування білків з утворенням S-нітрозотіолів, окиснення NO до NO_2^- та NO_3^- , розклад нітрозотіолів, що каталізується важкими металами (Fe, Cu тощо), а також відновлення NO_2^- та NO_3^- нітрат- та нітритредуктазами відповідно [5, 8]. Вважають, що нітрозотіоли є однією з форм депонування NO та важливим його джерелом за фізіологічних умов [5]. Отже, клітинний вміст NO та його фізіологічна дія є результируючою щонайменше трьох основних складових: власне NO-синтазної активності, нітрат- та нітритредуктазної активності а також наявності достатнього пулу депонованого NO. Останнім часом поширюється концепція, згідно з якою важливим чинником фізіологічної дії оксиду азоту є компартменталізація його клітинних пулів, внаслідок чого вона визначається локалізацією як сайтів безпосереднього утворення, так і сайтів-мішеней NO. У такому ракурсі значну увагу привертають мітохондрії як ланка системи перетворень NO та його похідних, АФА [8]. Відомо, що NO мітохондріального походження може відігравати неоднозначну роль у регуляції мітохондріальних функцій: пригнічувати відкриття МП [1], проте стимулювати продукцію АФК внаслідок інгібу-

вання цитохромоксидази та блокування транспорту електронів [12], що збільшує вихід АФК як побічних і проміжних продуктів редокс-реакцій дихального ланцюга [25].

Хоча мітохондрії є важливим елементом системи перетворень NO (окрім власної NO-синтазної активності в мітохондріях наявна також нітратредуктазна ланка циклу NO), її дослідження тільки розпочинається [7]. Є підстави припускати, що фізіологічна дія донорів NO на рівні мітохондрій, яка є складовою цитопротекторних ефектів оксиду азоту, може бути опосередкована не тільки власне мітохондріальним метаболізмом похідних азоту та кисню, але й взаємодією пулів АФА й АФК. Це питання недостатньо висвітлено у сучасній літературі. Майже повз увагу дослідників пройшла також залежність мітохондріальної продукції АФА й АФК, яка визначається кальційзалежними ферментами, мітоNOS і дегідрогеназами, а також комплексами дихального ланцюга від мітохондріального гомеостазу Ca^{2+} .

Отже, вивчення впливу NO на кальцій-транспортну систему мітохондрій як регуляторний чинник мітохондріального метаболізму АФА у системі перетворень NO є необхідним для глибшого розуміння підґрунтя кардіопротекторних механізмів дії фармакологічних донорів NO.

Метою цієї роботи було дослідити вплив екзогенного NO на акумуляцію Ca^{2+} в мітохондріях за допомогою введення різних доз фармакологічного донора NO нітрогліцерину, а також з'ясувати особливості метаболізму АФА й АФК у мітохондріях міокарда щурів, пов'язані з NO-залежною регуляцією кальцієвого гомеостазу мітохондрій.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на білих щурах лінії Вістар масою 200–250 г. Дослідним щурам вводили нітрогліцерин (НГ) внутрішньооче-

ревинно у дозах 0,25, 0,5, 1,0 і 1,5 мг/кг, а контрольним – фізіологічний розчин. Серця, видалені через 5 або 30 хв після введення НГ ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (2 °C), подрібнювали і гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища: 250 ммоль/л сахарози, 20 ммоль/л тріс-НCl-буфера, 1 ммоль/л EDTA; 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 EDTA і зберігали при 4 °C. Вміст білка визначали за методом Лоурі.

Транспорт кальцію реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 654 нм за наявності 70 мкмоль/л арсеназо-III. Для реєстрації транспорту Ca^{2+} мітохондрії вносили у стандартне середовище інкубації (ммоль/л): KCl – 120, KH_2PO_4 – 1, Na_2 -АТФ – 1, MgCl_2 – 1, CaCl_2 – 0,1, тріс-НCl буфер – 20; pH 7,4. Кальцієву ємність визначали як максимальну кількість кальцію, акумульовану у мітохондріях і виражали у наномолях Ca^{2+} на 1 мг білка. Функціональну активність МП за дії НГ оцінювали у тому самому середовищі інкубації за циклоспоринчутливим виходом Ca^{2+} після накопичення добавки 30 нмоль·мг⁻¹ Ca^{2+} та блокування Ca^{2+} -уніпортера рутенієвим червоним у концентрації 10⁻⁵ моль/л, як описано нами раніше [1] і виражали у відсотках інгібування відносно контролю, без циклоспорину А. Мітохондрії вносили у кількості 0,3 мг/мл.

Мембранний потенціал реєстрували у стандартному середовищі інкубації за зміною відносного значення світлопоглинання суспензії мітохондрій (1 мг/мл) при довжині хвиль 510 та 525 нм за методом Акермана за наявності 10 мкмоль/л сафраніну [9].

Утворення АФК реєстрували за зміною флуоресценції дихлорофлуоресцеїну при довжині хвиль збудження та емісії 504 та

525 нм відповідно, після попереднього навантаження суспензії мітохондрій 200 мкмоль/л зонда протягом 30 хв при 37 °С [28]. Середовище інкубації (ммоль/л): KCl – 120, KH_2PO_4 – 1, сукцинат Na – 5, CaCl_2 – 0,015, тріс-HCl буфер – 20; рН 7,4; вміст білка 1 мг/мл.

Концентрацію стабільних метаболітів NO, NO_2^- та S-нітрозотіолів визначали спектрофотометричним методом Гріна [20], вміст NO_3^- – бруциновим методом [6].

Активність мітоNOS оцінювали за зміною вмісту L-цитруліну, продукту ферментативного перетворення L-аргініну NOS у розрахунок на 1 мг білка [15].

Активність НАДН-залежної нітратредуктази [4] визначали за зміною вмісту нітрат-аніона в інкубаційній суміші такого складу: 4 ммоль/л NaNO_3 , 0,8 ммоль/л НАДН, в 0,1 моль/л фосфатному буфері (рН 7,0), 1–2 мг білка. Після 60 хв інкубації (37 °С) реакцію зупиняли додаванням 0,3 мл 2 н HClO_4 . У контрольних пробах HClO_4 вносили перед інкубацією. Після центрифугування 10 хв при 700 г у супернатанті визначали вміст нітрат-аніона [6]. Активність виражали за кількістю відновленого нітрату за 1 год на 1 мг білка.

Вміст пероксиду водню (H_2O_2) розраховували спектрофотометрично у KJ/лактопероксидазній системі у 0,05 моль/л фосфатному буфері (рН 7,33) при довжині хвилі 353 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання 26000 моль⁻¹·см⁻¹ [23].

Утворення гідроксильного радикала (·OH) оцінювали [17] в інкубаційній суміші: 20 ммоль/л 2-деокси-D-рибози, 1 ммоль/л H_2O_2 у 20 ммоль/л Na-фосфатному буфері (рН 7,4); генерацію ·OH-радикала – за утворенням малонового діальдегіду, який визначали за зміною поглинання при довжині хвилі 532 нм і виражали в умовних одиницях поглинання за 1 год на 1 мг білка.

Вміст вільного заліза (Fe^{2+}) визначали за стандартною методикою, використовуючи тест-набори фірми «Філісит Діагностика» (Україна).

У роботі використано такі реагенти: тріс (основа), (“Serva”, Німеччина), Na_2ATP , НАДН (“Reanal”, Угорщина), сульфаниламід, N-нафтилендіамінгідрохлорид, бруцин, 2-деокси-D-рибоза, лактопероксидаза, сафранін, дихлорофлуоресцеїндегідроацетат (“Sigma”, США), арсеназо-III, рутенієвий червоний, циклоспорин А, (“Fluka”, Німеччина) та реактиви вітчизняного виробництва марки ч.д.а. Розчини готували на бідистильованій воді. Достовірність оцінювали за критерієм t Стьюдента. Значення $P < 0,05$ вважали статистично достовірним.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 наведено результати вивчення впливу НГ на акумуляцію Ca^{2+} , вміст нітрат-аніона, кінцевого продукту метаболізму NO, а також функціональну активність циклоспоринчутливої пори, МП у мітохондріях серця щурів. Показано дозозалежну модульовальну дію екзогенного NO на кальційтранспортну систему мітохондрій і мітохондріальну систему оксиду азоту. Так, безпосередньо після введення НГ (≤ 1 мг/кг, 5 хв) накопичення Ca^{2+} у мітохондріях підвищується від $38,2 \pm 6,2$ до $(110,0 \pm 8,0)$ нмоль Ca^{2+} /мг білка ($P < 0,05$). Відбувається стрімке дозозалежне збільшення вмісту нітрат-аніона до $(1,4 \pm 0,1)$ мкмоль/мг білка, що свідчить про одночасну з надходженням Ca^{2+} активацію метаболізму АФА, початковою стадією якої є гідроліз і відновлення нітрогрупи НГ до NO з його наступним окисненням до NO_3^- [19, 24] (див. рис. 1,а,б, 1). Після введення НГ значно пригнічується функціональна активність МП (див. рис. 1,в, 2), яка корелює з її блокуванням оксидом азоту *in vitro*. Раніше нами було показано [3], що накопичення Ca^{2+} у мітохондріях, кальцієваємність і час затримки кальцію у матриксі за інших рівних умов визначається балансом між акумуляцією іонів Ca^{2+} через Ca^{2+} -уніпортер та вивільненням через циклоспоринчутливу МП. Тому пригнічення цикло-

споринчутливого вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій при введенні донора NO *in vivo* у дозі 1 мг/кг є однією з основних причин спостережуваної стимуляції його накопичення у мітохондріях міокарда. Збільшення кальцієвої ємності мітохондрій міокарда є короткотерміновим і починає зменшуватися протягом 30 хв після введення НГ (див. рис. 1,а, 2). Вміст нітрат-аніона через 30 хв після введення НГ також знижується майже до контрольних значень (див. рис. 1,б, 2), що свідчить про короткотермінову дію екзогенного NO як на кальційтранспортну систему мітохондрій, так і на мітохондріальний метаболізм АФА. Отже, введення НГ, з одного боку, призводить до швидкого посилення акумуляції Ca^{2+} у мітохондріях і видалення іонів Ca^{2+} із цитозолу у мітохондріальний матрикс, а з іншого – до швидкої активації мітохонд-

ріального метаболізму АФА, що виражається у дозозалежному прирості вмісту нітрат-аніона, кінцевого продукту метаболізму NO та продукту ферментативного перетворення НГ (див. рис. 1,а,б, 1).

Кореляція між дозозалежною дією NO на відкриття МП і посиленням метаболізму АФА у мітохондріях спонукає більш детально простежити особливості регуляції мітохондріального циклу NO під дією екзогенного донора оксиду азоту *in vivo*, безпосередньо пов'язані з NO -залежним блокуванням МП. Одночасність та односпрямованість дозозалежної дії донора NO як на акумуляцію Ca^{2+} , так і на продукцію АФА дає змогу пов'язати спостережувані зміни вмісту NO_3^- зі збільшенням матричного вмісту Ca^{2+} внаслідок блокування МП і кальційзалежною активацією мітоNOS. Отже, відкриття МП є важливим чинни-

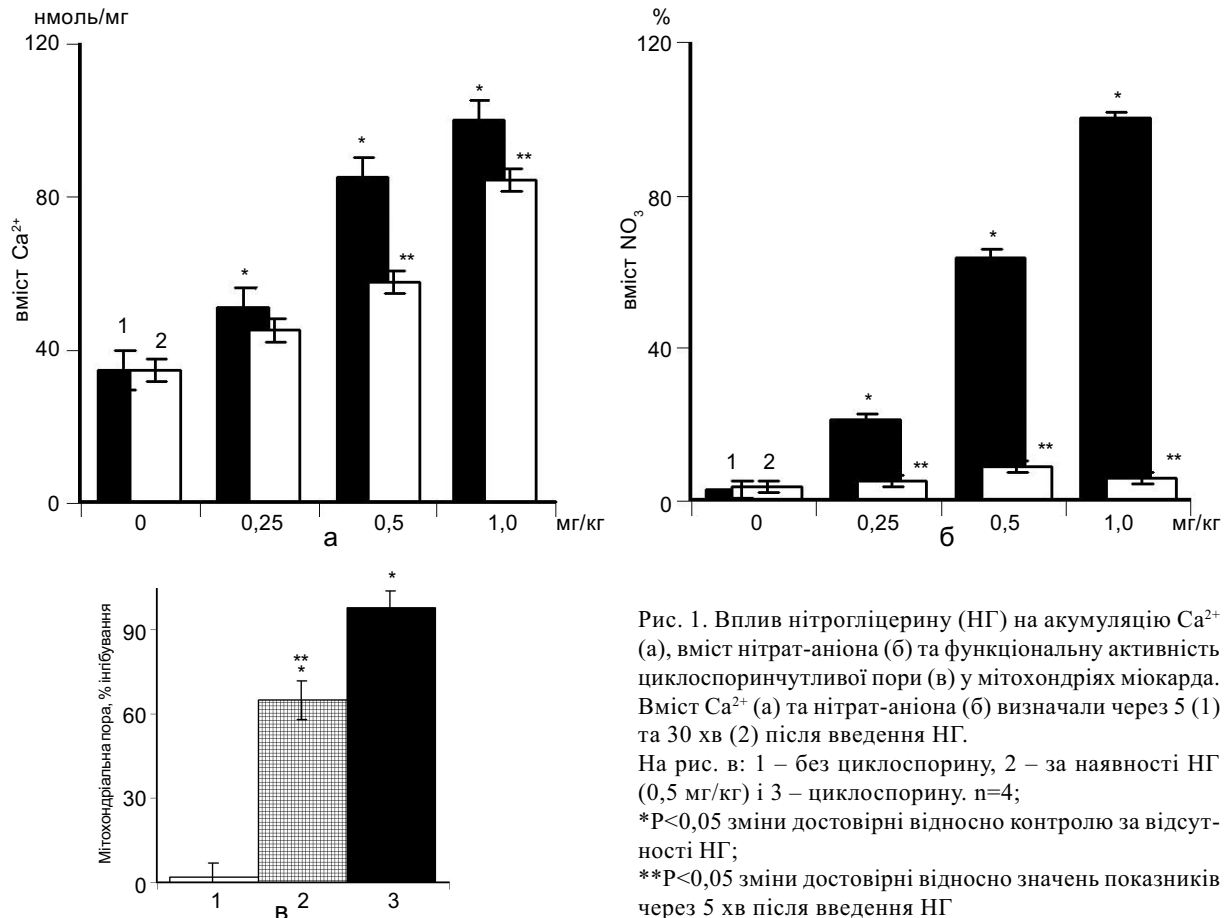


Рис. 1. Вплив нітрогліцерину (НГ) на акумуляцію Ca^{2+} (а), вміст нітрат-аніона (б) та функціональну активність циклоспоринчутливої пори (в) у мітохондріях міокарда. Вміст Ca^{2+} (а) та нітрат-аніона (б) визначали через 5 (1) та 30 хв (2) після введення НГ.

На рис. в: 1 – без циклоспорину, 2 – за наявності НГ (0,5 мг/кг) і 3 – циклоспорину. n=4;

* $P < 0,05$ зміни достовірні відносно контролю за відсутності НГ;

** $P < 0,05$ зміни достовірні відносно значень показників через 5 хв після введення НГ

ком регуляції як мітохондріального гомеостазу Ca^{2+} , так і мітохондріальної продукції АФА. Для більш детального висвітлення молекулярних механізмів, що є підґрунтям кардіопротекторної дії NO, доцільно проаналізувати особливості метаболізму АФА, пов'язані з блокуванням МП оксидом азоту та посиленням потенціалзалежного входу Ca^{2+} до мітохондріального матриксу. Для цього нами було досліджено вплив екзогенного NO як на вміст АФА, так і на основні ланки мітохондріального циклу NO: синтез NO мітоNOS і відновлення NO_3^- мітохондріальною нітратредуктазою. Висновки про вплив екзогенного NO на мітохондріальний метаболізм АФА робили на основі визна-

чення стабільних метаболітів: нітрит- та нітрат-аніонів (NO_2^- та NO_3^-) та загального вмісту S-нітрозотіолів, переважну частку яких становлять нітрозильовані високомолекулярні білки мітохондрій, що є основною формою депонування та джерелом NO у його метаболічних перетвореннях [5].

За одержаними результатами, збільшення кальцієвої ємності мітохондрій після введення НГ корелює з активацією мітохондріальної кальційзалежної ізоформи NOS, активність якої визначали за зміною вмісту L-цитруліну, який підвищувався до $(6,3 \pm 0,7)$ нмоль/мг білка в ізольованих мітохондріях міокарда (рис. 2, а, 1). Спостерігається також дозозалежна активація

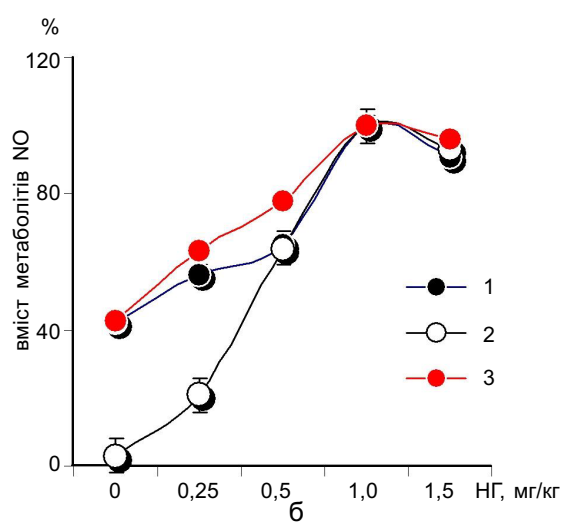
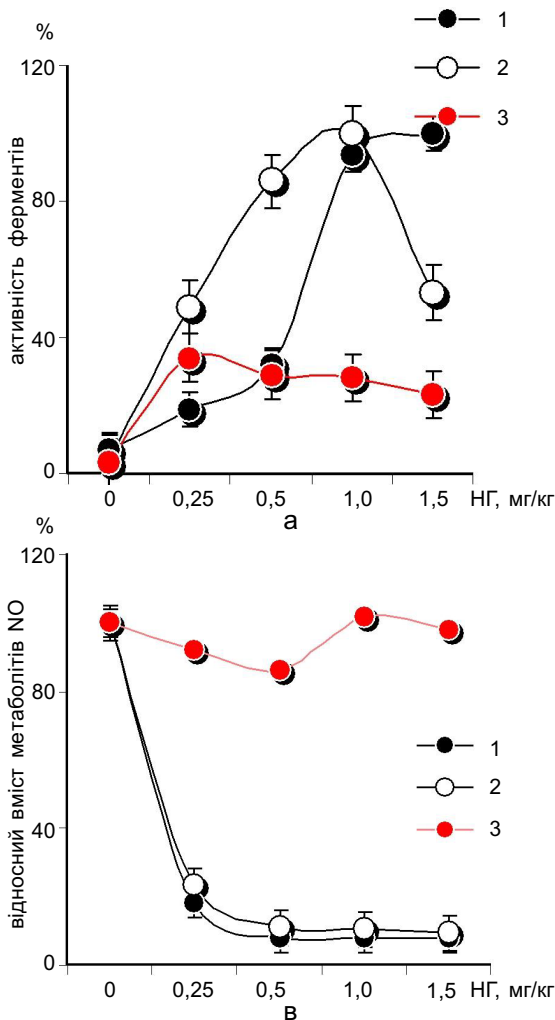


Рис. 2. Вплив нітрогліцерину (НГ) на активність мітоNO-синтази та нітратредуктази (а), вміст метаболітів NO (б) та співвідношення вмісту похідних NO (в) у мітохондріях міокарда. На а: 1 – мітоNO-синтаза, 2, 3 – нітротредуктаза через 5 і 30 хв відповідно після введення НГ; на б: 1 – NO_2^- ; 2 – NO_3^- ; 3 – S-нітрозотіоли; на в: 1 – $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$; 2 – S-нітрозотіоли/ NO_3^- ; 3 – NO_2^- /S-нітрозотіоли. $n=4$; $P<0,05$ зміни достовірні відносно контролю за відсутності НГ

нітратредуктази від $2,7 \pm 0,3$ до $(79,4 \pm 11,4)$ нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ (рис. 2,а, 2). Слід відмітити низьку базальну активність як мітоNOS, так і нітратредуктази, яка свідчить, що ці ферменти за фізіологічних умов знаходяться в стані субмаксимальної активності, котра може варіювати у широких межах, що є однією з передумов швидкої відповіді мітохондріальної системи NO на дію фізіологічних чинників, зокрема NO та Ca²⁺ за дії НГ. Згідно з одержаними результатами при дії НГ *in vivo* основною передумовою активації нітратредуктази з напівмаксимальним ефектом у дозі 0,5 мг/кг є безпосереднє стрімке збільшення вмісту нітратаніона, субстрату нітрат-редуктазної реакції через 5 хв після введення препарату (див. рис. 2,б, рис. 3,а), яке відбувається насамперед через гідроліз НГ, а також через активацію мітоNOS, та синтез NO *de novo* (див. рис. 2,а, 1; рис. 3, 2) внаслідок блокування МП і посиленого надходження Ca²⁺ до мітохондріального матриксу (див. рис. 1,а, 1). Відповідно спостерігається дозозалежне збільшення вмісту інших метаболітів NO: нітрит-аніона та S-нітрозотіолів, максимальний вміст яких становив $(19,8 \pm 2,4)$ нмоль/мг і $(1,53 \pm 0,03)$ нмоль/мг

білка (див. рис. 2,б, 1,3; рис. 3, 1,3).

Отже, активація біосинтезу NO *de novo* через активацію мітоNOS та за допомогою ферментативного перетворення НГ за участю альдегіддегідрогенази [19] посилює всі ланки метаболізму АФА (див. рис. 2, рис. 3,а). Проте, незважаючи на стрімкий приріст вмісту NO₃⁻ (від $0,045 \pm 0,06$ до $1,4$ мкмоль/мг $\pm 0,1$ мкмоль/мг) та активацію нітратредуктази (див. рис. 2,а, б; рис. 3,а, 2,4), приріст вмісту NO₂⁻ відносно незначний (від $8,3 \pm 0,7$ до $19,8$ мкмоль/мг $\pm 0,4$ нмоль/мг) і співвідношення NO₂⁻/NO₃⁻ змінюється на користь NO₃⁻; кінцевого продукту окиснення NO (див. рис. 2,в, 1). Посилення всіх ланок метаболізму АФА під дією донора NO проявляється також і в збільшенні депонування NO у вигляді S-нітрозотіолів, пул яких за абсолютними значеннями зростає більше ніж удвічі (від $0,66 \pm 6,5$ до $1,53$ нмоль/мг $\pm 0,03$ нмоль/мг). Проте співвідношення нітрозилування мітохондріальних білків з утворенням нітрозотіолів та утворення NO₃⁻ також змінюється на користь NO₃⁻; що свідчить як про посилення окисдаивних процесів у мітохондріях, попри активацію нітратредуктази та ферментативного відновлення NO (див. рис. 2,в, 2;

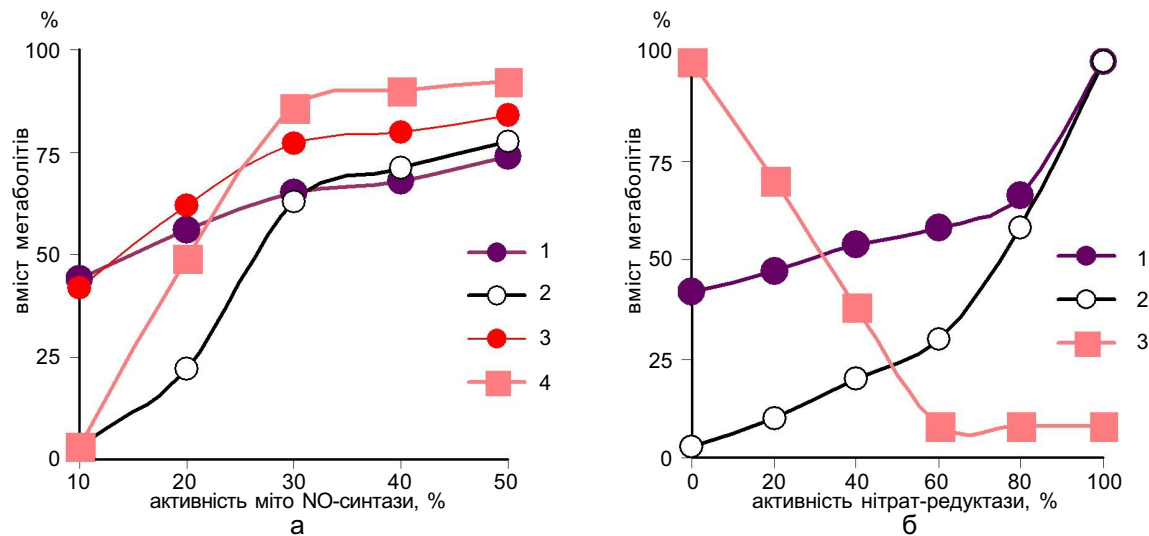


Рис. 3. Вміст метаболітів NO за умов активації мітоNO-синтази (а) та нітратредуктази (б) нітрогліцерином. На а: 1 – NO₂⁻, 2 – NO₃⁻, 3 – S-нітрозотіоли 4 – нітратредуктаза; на б: 1 – NO₂⁻, 2 – NO₃⁻, 3 – NO₂⁻/NO₃⁻. n=4; P<0,05 зміни достовірні відносно контролю, за відсутності нітрогліцерину; а, б: активність ферментів у відсотках відносно максимального значення

рис. 3,а, 4), так і про значний лаг-період у відновленні пулу NO_3^- , вивільнення якого спостерігається через 5 хв після введення НГ (див. рис. 1,б, 1,2).

Як зазначалося вище, посилення вільнорадикальних реакцій з утворенням АФК може відігравати значну, хоча ще малодосліджену роль у метаболізмі АФА. Тому для більш ґрунтового аналізу механізмів, що визначають основні шляхи метаболізму АФА за дії екзогенного NO, нами досліджено також вплив різних доз НГ на утворення основних продуктів неповного відновлення кисню: гідропероксиду (H_2O_2) та гідроксил-радикала ($\cdot\text{OH}$). Результати показують, що введення НГ значно активує утворення АФК (рис. 4, 1,2), що, як і метаболізм АФА, корелює з інгібуванням МП, посиленням надходженням Ca^{2+} до мітохондрій та активацією кальційзалежних дегідрогеназ [18] (див. рис. 1,а). Окрім посиленого утворення гідропероксиду та $\cdot\text{OH}$ -радикала, спостерігається стрімкий приріст вмісту вільного заліза (див. рис. 4, 3), каталізатора перетворень АФК за відомими реакціями Фентона та Хабер-Вайса [19]: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH} + \text{OH} + \text{Fe}^{3+}$. За літературними даними, джерелом вільного заліза може бути окисна деградація мітохондріальних залізовмісних білків [11, 12], яка відбувається внаслідок посилення продукції АФК. Активація вільнорадикальних реакцій за участю останніх, посилена наявністю Fe^{2+} як каталізатора, корелює як зі стрімким збільшенням вмісту продуктів перекисації ліпідів – дієнових кон'югатів (див. рис. 4, 4), так і посиленням окисного метаболізму АФА з утворенням кінцевого продукту, NO_3^- , попри активацію нітратредуктази, відновної ланки циклу NO (див. рис. 2–3).

Аналіз одержаних результатів показує, що зі збільшенням дози НГ відбувається майже однаковий у відсотковому співвідношенні, помірний приріст вмісту NO_2^- та нітрозотіолів (див. рис. 2, б, 2,3). Натомість,

незважаючи на активацію нітратредуктази (див. рис.2, а, 2; рис.3, а, 4), спостерігається стрімке збільшення вмісту NO_3^- (див. рис. 2,б, 2; 3,а,б, 2). Це свідчить про посилення окисних процесів і корелює зі збільшенням продукції АФК (зокрема H_2O_2), вільного заліза і продуктів перекисного окиснення ліпідів (див. рис. 4, 1,3,4). Вивільнення заліза, як розлядалось вище, призводить до подальшої активації метаболізму АФК і посиленого утворення $\cdot\text{OH}$ -радикала (див. рис. 4, 2) внаслідок взаємодії заліза з гідропероксидом (реакція Фентона). Слід зазначити, що гіперпродукція високореакційних токсичних АФК, разом із одночасним значним збільшенням пулу NO_3^- , є вірогідним джерелом утворення пероксинітриту (ONOO^-), оскільки нітратаніон є джерелом NO через його відновлення. Одночасна генерація значної кількості супероксиду в мітохондріях призводить до утворення пероксинітриту [29], який швидко метаболізується вільнорадикальним ($\text{ONOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \cdot\text{NO}_2 + \text{OH}$), та/або нерадикальним шляхом ($\text{ONOOH} \rightarrow \text{H}^+ + \text{NO}_3^-$), що у свою чергу спрямовано

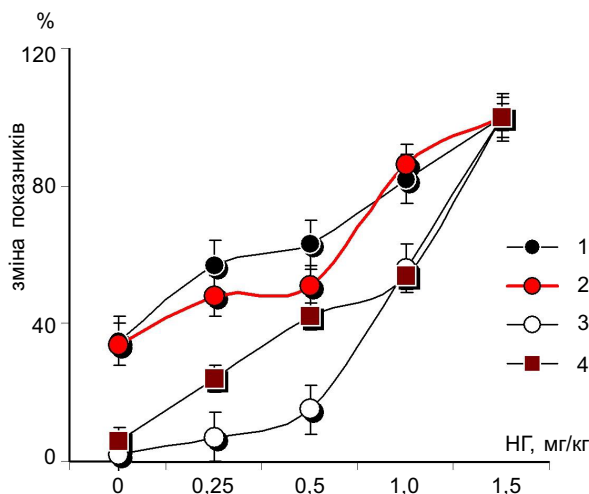


Рис. 4. Вплив нітрогліцерину (НГ) на вміст гідропероксиду (1), генерацію $\cdot\text{OH}$ -радикала (2), вміст вільного заліза (3) та дієнових кон'югатів (4) через 5 хв після введення НГ у відсотках від максимальних значень. $n=4$; $P<0,05$ зміни достовірні відносно контролю

на підтримання високого рівня генерації $\cdot\text{OH}$ -радикала та вмісту NO_3^- .

Результати визначення вмісту стабільних метаболітів АФА дають змогу проаналізувати зміни частки окремих продуктів у загальному пулі похідних NO та встановити основні джерела утворення NO_3^- . Так, виходячи із співвідношення вмісту NO_2^- та нітрозотіолів до вмісту NO_3^- , можна зробити висновок, що збільшення вмісту останнього відбувається головним чином внаслідок вичерпання пулу нітрозотіолів, S-нітрозотіоли $\rightarrow \text{NO}_3^-$ та NO_2^- , $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ (див. рис. 2, в, 1–2). Водночас абсолютний приріст вмісту NO_2^- , який також спостерігається в мітохондріях міокарда після введення НГ (див. рис. 2, б, 1), відбувається не за рахунок нітрозотіолів, оскільки співвідношення $\text{NO}_2^-/\text{S-нітрозотіоли}$ не зазнає достовірних змін (див. рис. 2, в, 3), а, можливо, є наслідком одночасної короткотермінової активації як нітратредуктази, $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$, так і мітоNOS, $\text{NO} \rightarrow \text{NO}_2^-$ (див. рис. 2, а, 1, 2; рис. 3, а, б, 1).

Отже, під дією екзогенного NO in vivo

внаслідок інгібування МП і посиленого надходження Ca^{2+} до мітохондріального матриксу швидко активуються всі ланки циклу NO в мітохондріях: NOS (мітоNOS), нітратредуктазна та депонування NO у вигляді S-нітрозотіолів. Як вже зазначалося вище, за літературними даними мітоNOS є кальційзалежною і безпосередньо активується внаслідок збільшення матриксного вмісту Ca^{2+} , що стрімко підвищує продукцію АФА одразу після введення НГ. Стрімкий приріст вмісту нітратаніона, субстрату нітрат-редуктазної реакції, слідом за активацією мітоNOS, у свою чергу призводить до стрімкого зростання нітратредуктазної активності в мітохондріях, що є відновною ланкою циклу NO. Слід зазначити, що найбільш помітна активація окисних процесів спостерігається в межах високих доз НГ (0,5–1,5 мг/кг), за яких уже надалі не збільшується кальційова ємність мітохондрій, проте значно підвищується вміст іонізованого заліза, яке є каталізатором утворення таких високотоксичних АФК, як $\cdot\text{OH}$ -радикал (див. рис. 4, 2, 3). Отже, під

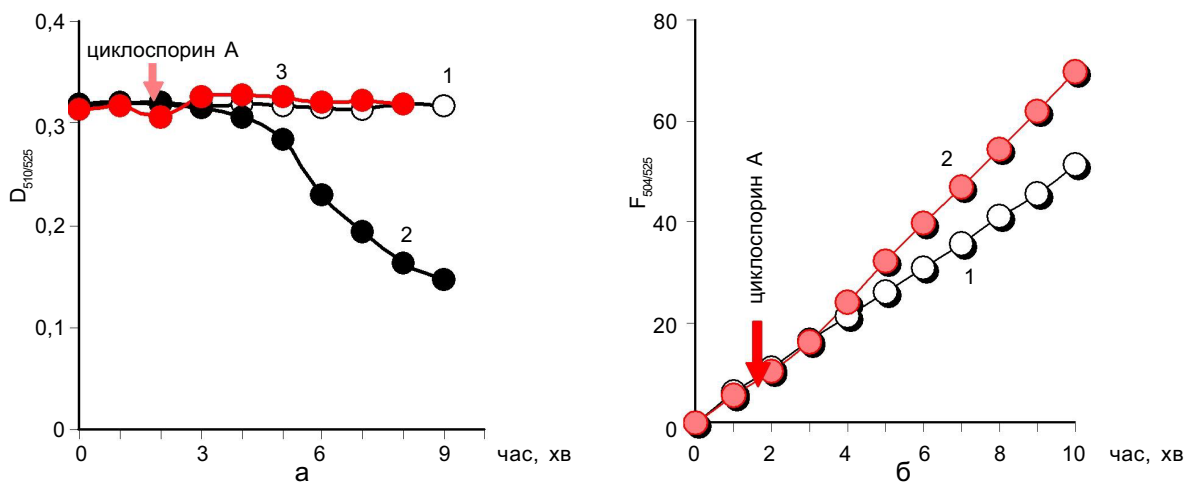


Рис. 5. Вплив оборотного відкриття циклоспоринчутливої пори на мембранний потенціал (а) та утворення активних форм кисню (АФК; б) у мітохондріях. Зміну мембранного потенціалу (а) визначали за наявності циклоспорину А (1) та без нього (2), а також за його внесення після відкриття пори, як показано стрілкою (3). Утворення АФК (б) реєстрували за зміною флуоресценції дихлорофлуоресцину за відсутності циклоспорину А (1) та за його додавання після відкриття пори, як показано стрілкою (2). За всією абсцисе: час, хв. За всією ординат – відносна величина світлопоглинання, $D_{510/525}$, ум.од.; відносні величини флуоресценції, $F_{504/525}$, ум.од., за вирахуванням базальної флуоресценції мітохондрій, яку визначали за наявності 10^{-6} моль/л ротенону та 10^{-6} моль/л CCCP

дією донора NO внаслідок блокування МП і підвищення кальцієвої ємності створюються передумови як для збільшення вмісту АФА через активацію мітоNOS, так і для прогресивного зростання виходу токсичних АФК при високих дозах НГ, уже без участі Ca^{2+} , а через каталізоване залізом окисно-відновне перетворення АФК з наступною регенерацією двовалентного заліза.

Отже, блокування МП оксидом азоту, утвореним конститутивно внаслідок активації мітоNOS *in vivo* підвищує матриксний вміст Ca^{2+} й посилює метаболізм АФК і АФА у мітохондріях міокарда за умов введення донора NO НГ. Особливість метаболічних перетворень NO в мітохондріях полягає у взаємодії пулів АФК і АФА, яка багаторазово посилює вільнорадикальні реакції за участю пероксинітриду, $\cdot\text{OH}$ -радикала та вільного заліза. Таким чином, важлива фізіологічна функція МП полягає у запобіганні гіперпродукції АФА та АФК, яка може бути шкідливою для організму і сприяти розвитку патологічних станів. Цей висновок підтверджується результатами дослідження взаємозв'язку оборотного відкривання МП та утворення АФК у мітохондріях *in vitro*.

Так, за нашими результатами, відкривання МП супроводжується зменшенням продукції АФК в енергізованих мітохондріях порівняно з контролем, за наявності циклоспорину А, внаслідок часткової деполяризації мітохондрій (рис. 5,а, 2; 5,б, 1). Відомо, що високий мембранний потенціал є однією з причин гіперпродукції АФК, тоді як деполяризація зменшує їх утворення в мітохондріях [10, 26]. Відповідно, відкривання МП, яке супроводжується мембранною деполяризацією (див. рис. 5,а, 2), пригнічує утворення АФК (див. рис. 5,б, 1), тоді як її блокування циклоспорином А, слідом за відкриванням реполяризує мітохондрії та підвищує швидкість утворення АФК до контрольних значень (див. рис. 5,а,

3; б, 2), що корелює із ефектом посилення продукції вільнорадикальних похідних кисню внаслідок блокування МП оксидом азоту *in vivo* (див. рис. 1,в, 2; рис. 4, 1,2).

Одержані результати свідчать, що за умов посилення вільнорадикальних реакцій у мітохондріях внаслідок блокування МП включаються механізми взаємопосилення продукції АФА (утворення та розпад пероксинітриду) і АФК (утворення супероксиду, гідропероксиду та $\cdot\text{OH}$ -радикала), яке призводить до загальної гіперпродукції вільнорадикальних похідних кисню та азоту. Так, гіперпродукція супероксиду внаслідок зростання пулу H_2O_2 , як показано вище, посилює утворення NO_3^- через розпад пероксинітриду. Водночас з літературних джерел відомо, що гіперпродукція АФА також у свою чергу може призводити до гіперпродукції АФК через NO-залежне інгібування I та IV комплексів дихального ланцюга, зокрема, пероксинітридом та S-нітрозотіолами з наступним блокуванням транспорту електронів і посиленням виходу АФК [14]. Оскільки продукція останніх значною мірою контролюється мембранним потенціалом мітохондрій [10, 26], зрозуміло, що відкривання МП, яке призводить до часткової мембранної деполяризації внаслідок роз'єднання дихального ланцюга через посилення циклоспоринчутливого трансмембранного Ca^{2+} - H^+ -обміну [3], супроводжується пригніченням вільнорадикальних реакцій з утворенням АФК.

Отже, МП за нормальних фізіологічних умов є важливим чинником регуляції вільнорадикальних процесів у мітохондріях, яка здійснюється за допомогою модуляції енергетичного стану органел і матриксного вмісту Ca^{2+} . Її пригнічення екзогенним NO призводить до багаторазового посилення, в тому числі й взаємопосилення, продукції АФК і АФА, що й визначає особливості їхнього метаболізму в мітохондріях за дії фармакологічного донора NO НГ.

ВИСНОВКИ

1. Під дією екзогенного NO *in vivo* внаслідок інгібування МП у мітохондріях міокарда та посиленого надходження Ca^{2+} до мітохондріального матриксу активуються всі ланки циклу NO: NOS (мітоNOS), нітратредуктазної та депонування NO у вигляді S-нітрозотіолів.

2. Особливості мітохондріального метаболізму АФК й АФА за дії донора NO полягають у багаторазовому посиленні, в тому числі й взаємопосиленні їх продукції через вивільнення заліза й каталізованої Fe^{2+} продукції токсичних АФК (зокрема, ОН-радикала), а також утворення ОН-радикала внаслідок декомпозиції пероксинітриду.

3. МП *in vivo* є важливим регуляторним чинником мітохондріального метаболізму АФА й АФК. Її пригнічення оксидом азоту призводить до посилення вільнорадикальних реакцій у мітохондріях, що й визначає особливості перетворень АФК й АФА за умов введення фармакологічного донора NO НГ.

О.В. Аكوпова, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюруба,
Л.И. Колчинская, В.Ф. Сагач

МЕТАБОЛИЗМ АКТИВНЫХ ФОРМ АЗОТА И КИСЛОРОДА В МИТОХОНДРИЯХ МИОКАРДА КРЫС В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА

Проанализированы особенности метаболизма активных форм азота и кислорода (АФА и АФК соответственно) в митохондриях миокарда крыс в условиях введения *in vivo* разных доз донора NO нитроглицерина (НГ). Показано, что его введение приводит к дозозависимому повышению кальциевой емкости митохондрий вследствие ингибирования циклопоринчувствительной митохондриальной поры (МП), которое коррелирует с активацией митохондриальной кальцийзависимой изоформы NO-синтазы (NOS). Наблюдается также дозозависимая активация нитратредуктазы, однако количество образующегося нитрит-аниона (NO_2^-) снижается, что отвечает изменению соотношения $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ в пользу NO_3^- , конечного продукта метаболизма NO. Соотношение между нитрозилированием митохондриальных белков с образованием нитрозотіолів и выходом NO_3^- также изменяется в пользу последнего,

что свидетельствует об усилении окислительных процессов в митохондриях. Показано, что с повышением дозы НГ возрастает количество продуктов перекисного окисления липидов, маркера окислительного повреждения мембран. Установлено, что в основе оксидативного стресса лежит дозозависимое возрастание продукции АФК (гидроксилрадикала и митохондриального пула H_2O_2), а также повышение содержания свободного железа вследствие окислительной деградации митохондриальных железосодержащих белков. Взаимодействие железа с гидропероксидом по реакции Фентона с образованием гидроксилрадикала, а также свободнорадикальное разложение пероксинитрита, источником которого служит NO_3^- , является вероятной причиной многократного усиления продукции АФК, повышения перекисного окисления липидов и окисления пулов NO. Блокирование МП оксидом азота, в том числе и синтезированным в митохондриях *in vivo*, приводит к активации обоих звеньев цикла NO – NO-синтазного вследствие кальцийзависимой активации митохондриальной NOS, и нитратредуктазного, вследствие возрастания пулов NO_3^- . Повышение продукции АФК, многократно усиливается высвобождением железа, приводит к оксидативному стрессу митохондрий и сдвигу метаболизма АФА в сторону образования NO_3^- , несмотря на активацию нитратредуктазного звена цикла NO. Показано, что открытие МП *in vitro* уменьшает продукцию АФК, тогда как ее блокирование циклоспоринном А восстанавливает их образование до контрольных значений. Полученные результаты свидетельствуют, что МП является важным звеном регуляции метаболизма АФК и АФА в митохондриях.

Ключевые слова: активные формы азота и кислорода, нитроглицерин, кальций, митохондриальная пора, митохондрии миокарда.

O.V. Akopova, Yu.P. Korkach, A.V. Kotsuruba,
L.I. Kolchinskaya, V.F. Sagach

REACTIVE NITROGEN AND OXYGEN SPECIES METABOLISM IN RAT HEART MITOCHONDRIA UPON ADMINISTRATION OF NO DONOR IN VIVO

Some aspects of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) metabolism in rat heart mitochondria under administration of different doses of nitroglycerine (NG) *in vivo* are discussed. It is shown that NG administration results in a dose-dependent increase in Ca^{2+} -uptake in mitochondria, due to the dose-dependent inhibition of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) *in vivo* and the activation of Ca^{2+} -dependent mitochondrial NOS. It was shown that NOS activity increases in accord with the increase of Ca^{2+} -uptake in mitochondria. The dose-dependent activation of nitrat-reductase is observed. However, nitrite production decreases dose-dependently, according to the change of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ratio on behalf of NO_3^- ; the end product of NO transformations.

The relation between nitrosylation of mitochondrial proteins with the nitrosothiols formation and nitrate production also changes towards NO_3^- , which shows the activation of oxidation reactions in heart mitochondria after NG administration. Accordingly, dose-dependent increase in lipid peroxidation (LP) products is shown, the hallmark of the membrane damage in mitochondria. It is established that the cause of oxidative stress, besides the dose-dependent increase in ROS production (hydroperoxide, superoxide and hydroxyl-radical), lies in the increase of free iron content, derived from the oxidation of mitochondrial iron-containing proteins. The iron interaction with hydroperoxide following Fenton reaction as well as free-radical decomposition of peroxyxynitrite, derived from NO_3^- are the possible cause of manifold increase in ROS as well as LP production, and RNS oxidation to NO_3^- . Thus, NO-dependent MPTP blockage, due to NO synthesis in mitochondria in vivo, results in the activation of both constituents of NO-cycle: NOS-dependent, due to Ca^{2+} -dependent activation of mitochondrial NOS, and nitrate-reductase-dependent, due to the increase in NO_3^- formation. However, increase in ROS production, augmented by the iron release, leads to the oxidative stress and the shift of RNS metabolism towards NO_3^- formation, in spite of the activation of nitrate-reductase-dependent pathway of NO-cycle. It is shown that reversible MPTP opening in vitro diminishes ROS production, whereas MPTP blockage by cyclosporine A restores the ROS formation to control level. Thus, MPTP-dependent inhibition of ROS overproduction both in vitro and in vivo, shows the importance of MPTP in the regulation of ROS and RNS metabolism in mitochondria.

Key words: reactive nitrogen and oxygen species, nitroglycerine, calcium, mitochondrial permeability transition pore, heart mitochondria.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology Ukrainian National Academy of Science, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Акопова О.В., Сагач В.Ф. Высвобождение кальция из митохондрий печени крыс в условиях коллапса мембранного потенциала // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, №3. – С. 68–75.
2. Акопова О.В., Харламова О.М., Коцюруба А.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Вплив оксиду азоту на Na^+ , K^+ -АТФазу в тканині аорти щурів // Фізіол. журн. – 2009. – 55, №1. – С. 27–35.
3. Акопова О.В. Роль митохондриальної пори в трансмембранному обміні кальція в митохондриях // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80, №3. – С. 40–47.
4. Аликулов З.Л., Львов Н.П., Кретович В.Л. Нитрат-и нитритредуктазная активность молока // Биохимия. – 1980. – 45, №9. – С. 1714–1718.
5. 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.
6. Коркач Ю.П., Дудченко Н.О., Коцюруба А.В. Роль негемового заліза у протекторній дії екдистерону на розвиток стрептозототиніндукованої гіпоглікемії у щурів // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80, №1. – С. 46–51.
7. Костюк П.Г., Костюк О.П., Лук'янець О.А. Іони кальцію у функції мозку – від фізіології до патології. – К.: Наук. думка, 2005. – 198 с.
8. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1998. – 159 с.
9. Akerman K.E.O., Wikstrom M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential // FEBS Lett. – 1976. – 68, №2. – P. 191–197.
10. Akopova O.V., Kolchinskaya L.I., Nosar V.I., Smirnov A.N., Malysheva M.K., Mankovska I.N., Sagach V.F. The effect of mitochondrial permeability transition pore opening on reactive oxygen species production in rat brain mitochondria // Укр. біохім. журн. – 2011. – 83, № 6 – P. 46–55.
11. Brand M.D., Affouit Ch., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Pakay J., Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins // Free Rad. Biol. Med. – 2004. – 37, №6. – P. 755–767.
12. Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals // Cell Biol. – 1990. – 68, №5. – P. 989–998.
13. Blaustein M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness // Amer. J. Physiol. – 1993. – 264. – P. C1367–C1387.
14. Borutaite V., Brown G.C. S-nitrosothiol inhibition of mitochondrial complex I causes a reversible increase in mitochondrial hydrogen peroxide production // Biochim. and Biophys. Acta. – 2006. – 1757. – P. 562–566.
15. 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.
16. Brookes P.S., Yoon Y., Robotham J.L., Anders M.W., Sheu Sh.-Sh. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle // Amer. J. Physiol. – 2004. – 287. – C817–C833.
17. 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.
18. McCormack J.G., Denton R.M. Mitochondrial Ca^{2+} transport and the role of intramitochondrial Ca^{2+} in the regulation of energy metabolism // Dev. Neurosci. – 1993. – 15. – P. 165–173.
19. Daiber A., Wenzel P., Oelze M. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) – maker of and marker for nitrate tolerance in response to nitroglycerine treatment // Chem. Biol. Interact. – 2009. – 178, №1–3. – P. 40–47.
20. Green L.C., David A.W., Glogowski J. Analysis of ni-

- trate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.* – 1982. – **126**, №1. – P. 131–138.
21. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts // *FASEB J.* – 1987. – **1**, № 5. – P. 358–364.
22. Hoppe U.C. Mitochondrial calcium channels // *FEBS Lett.* – 2010. – **584**. – P. 1975–1981.
23. Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system // *Eur. J. Biochem.* – 1984. – **141**, № 1. ²P. 69–74.
24. Ignarro L.J., Napoli C., Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide // *Circulat. Res.* – 2002. – **90**, №1. – P. 21–28.
25. Kakkar P., Singh B.K. Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control // *Mol. Cell Biochem.* – 2007. – **305**. – P. 235–253.
26. Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // *FEBS Lett.* – 1997. – **416** – P. 15–18.
27. Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.-L., Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death // *FASEB J.* – 1995. – **9**. – P. 1277–1287.
28. Lacerda L., Smith R.M., Opie L., Lecour S. TNF α -induced cytoprotection requires the production of free radicals within mitochondria in C₂C₁₂ myotubes // *Life Sci.* – 2006. – **79**. – P. 2194–2201.
29. Radi R., Beckman J.C., Bush K.M., Freeman B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1991. – **288**. – P. 481–487.
30. Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game // *J. Physiol.* – 2000. – **529**, №1. – P. 37–47.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: luko@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 07.12.2011