

УДК 612.014.546.174.591.412

## РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ У ПІДВИЩЕНІЙ ЧУТЛИВОСТІ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ПОРИ ДО ВІДКРИВАННЯ КАЛЬЦІЕМ У СЕРЦІ СТАРИХ ЩУРІВ

*Вавілова Г.Л., Рудик О.В., Тимошук С.В., Сагач В.Ф.*

*Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця, НАН України, Київ*

Оксид азоту (NO) в організмі генерується цитозольними та мітохондріальними NO-синтазами (NOS) під час перетворення L-аргініну в цитрулін [3]. В організмі NO за різних концентрацій може виявляти двосторонню дію. За фізіологічних умов продукція NO вносить істотний вклад у підтримання та регуляцію судинного тону та клітинного метаболізму, зокрема в міокарді [4]. На сьогодні досліджено зв'язок між підвищеними концентраціями NO та комплексами дихального ланцюгу, внаслідок чого може відбуватись інгібування дихальної функції мітохондрій. Так, тривале NO-залежне інгібування дихального ланцюга може призводити до посиленого утворення вільних радикалів кисню та азоту (АФК та АФА), що призводить до незворотної модифікації білків і пригнічення основної мітохондріальної функції – синтезу АТФ, а також вивільнення з мітохондрій цитохрому с і активації каспаз, що спонукає клітини до апоптозу [6].

На сьогодні актуальним є дослідження ролі NO у відкриванні мітохондріальної пори (МП) перехідної проникності (mitochondrial permeability transition pore, МРТР), яке є невід'ємною ключовою подією при апоптотичній загибелі клітин.

Метою роботи було дослідити вплив донора NO – нітропрусида натрію (НП-Na), а також дію блокатора NO-синтази – гідрохлорид  $N_{\text{ш}}$ -нітро-L-аргінін метилового естеру (L-NAME) на чутливість  $Ca^{2+}$ -індукованого відкривання МП у серці дорослих і старих щурів.

### Методика

В експериментах використовували білих щурів-самців лінії Вістар віком 5-6

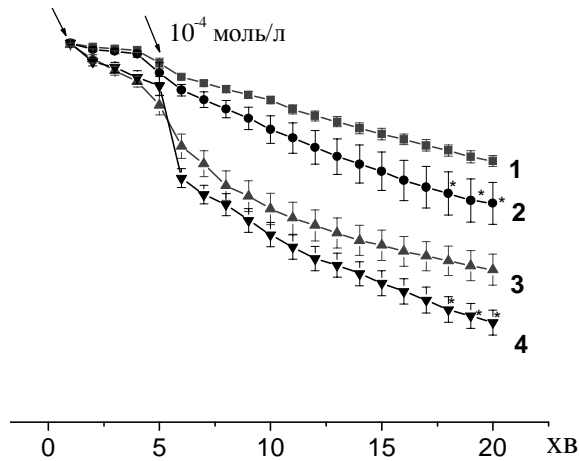
міс. (дорослі) та 24-27 міс. (старі). Тварин утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Серця промивали охолодженим 0,9% розчином KCl. Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування як описано [1], в нашій модифікації. Дослідження відкривання МП проводили за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій серця щурів. Для цього ізольовані мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс – HCl – 25,  $KH_2PO_4$  – 3, рН 7.4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і за допомогою спектрофотометра реєстрували зниження їх оптичної густини при  $\lambda=520$  нм за 5 хв до і через 15 хв після їх набухання при дії індуктора в інкубаційному середовищі. Для реєстрації  $Ca^{2+}$ -індукованого відкриття МП використали кальцій в концентрації  $10^{-4}$  моль/л. Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі. Концентрація білка в інкубаційному середовищі становила 0,5 мг/мл. В якості контролю використовували суспензію нативних мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора з реєстрацією оптичної густини протягом 20 хв.

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excel (MS Office XP) та Origin 6.0 (Microcall Inc, США).

### Результати та їх обговорення

Оскільки L-NAME у межах концентрацій  $10^{-7}$ - $10^{-5}$  моль/л помітно не впливав на  $Ca^{2+}$ -індуковане набухання мітохондрій, для досягнення ефекту повного



**Рис. 1.** Ca<sup>2+</sup>-індуковане набухання мітохондрій серця дорослих (n=8) і старих (n=6) щурів за умов блокади NOS (L-NAME, 10<sup>-4</sup> моль/л).  
 1 – мітохондрії серця дорослих щурів за відсутності L-NAME,  
 2 – мітохондрії серця дорослих щурів у присутності L-NAME,  
 3 – мітохондрії серця старих щурів за відсутності L-NAME,  
 4 – мітохондрії серця старих щурів у присутності L-NAME .

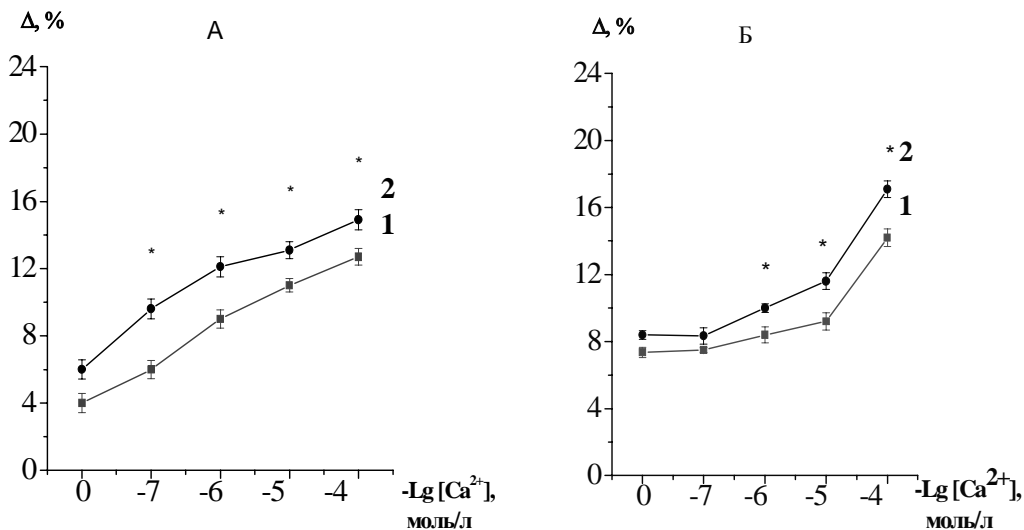
інгібування NO-синтази в мітохондріях використовували L-NAME у концентрації 10<sup>-4</sup> моль/л. Показано, що преінкубація мітохондрій з L-NAME (10<sup>-4</sup> моль/л) достовірно збільшувала величину Ca<sup>2+</sup>-індукованого набухання мітохондрій серця як дорослих, так і старих щурів, у порівнянні

з такими за відсутності L-NAME (рис.1).

Причому величина Ca<sup>2+</sup>-індукованого набухання мітохондрій в серці дорослих щурів у присутності L-NAME наближалася до такої мітохондрій серця старих тварин за відсутності блокатора. Цей факт вказує на те, що зменшення рівня вироблення NO в мітохондріях як результат блокади NOS, можливо, має відношення до підвищення чутливості мітохондрій до індуктора МП – Ca<sup>2+</sup> в серці старих щурів, а саме, зменшує резистентність мітохондріальної мембрани до цього індуктора МП.

Величина Ca<sup>2+</sup>-індукованого набухання мітохондрій серця старих щурів у присутності L-NAME перевищувала таку для мітохондрій серця дорослих щурів. Продемонстровано,

що попередня інкубація суспензії мітохондрій з L-NAME збільшувала величину набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів при використанні Ca<sup>2+</sup> не лише в концентрації 10<sup>-4</sup> моль/л, але й в діапазоні досліджуваних концентрацій



**Рис. 2.** Набухання мітохондрій серця дорослих (Б) (n = 3) і старих (А) щурів (n = 3) при дії різних концентрацій кальцію за умов відсутності (1) та присутності (2) блокатора NOS (L-NAME, 10<sup>-4</sup> моль/л).

\* – різниця достовірна (P < 0,05) по відношенню до величини за умов відсутності блокатора NOS

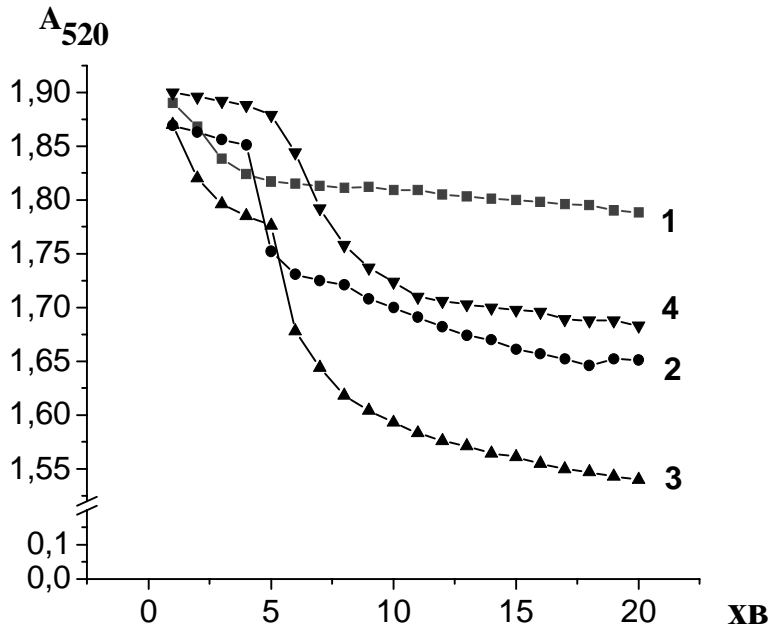


Рис. 3. Ca<sup>2+</sup>-індуковане набухання мітохондрій серця старих щурів за умов блокади NOS та введення в інкубаційне середовище донору NO (НП-На): 1 – контроль; 2 – дія Ca<sup>2+</sup>, 10<sup>-4</sup> моль/л; 3 – преінкубація з L-NAME (10<sup>-4</sup> моль/л), дія Ca<sup>2+</sup>, 10<sup>-4</sup> моль/л; 4 – преінкубація з L-NAME (10<sup>-4</sup> моль/л), додавання НП-На (10<sup>-4</sup> моль/л), дія Ca<sup>2+</sup>, 10<sup>-4</sup> моль/л.

126

10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup> моль/л (рис. 2).

Для перевірки того, що такий “негативний” щодо відкриття МП ефект блокування активності NOS в мітохондріях кардіоміоцитів обумовлений саме недостатнім виробленням NO, провели серію експериментів з використанням донору NO нітропрусида натрію. Так введення в інкубаційне середовище НП-На (10<sup>-4</sup> моль/л) після додавання L-NAME відновлювало типове Ca<sup>2+</sup>-індуковане набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів (рис. 3). Крім того, преінкубація мітохондрій безпосередньо з НП-На частково (в середньому на 50%) попереджала Ca<sup>2+</sup>-індуковане набухання мітохондрій серця дорослих і старих щурів. Останній факт підтверджує уявлення про захисну роль NO в серці щурів.

Експериментальні результати, отримані на ізольованих мітохондріях, були

підтверджені біохімічними дослідженнями проведеними нами, з визначення активності cNOS та iNOS [2]. Знайдено, що активність iNOS незначним чином підвищується в мітохондріях серця старих щурів і становить 2,58±0,33 нмоль/хв\*мг білка у порівнянні з дорослими – 1,73±0,24 нмоль/хв\*мг білка. В той час як активність cNOS достовірно знижується в мітохондріях серця старих щурів у порівнянні з дорослими і становить 3,64±0,27 пмоль/хв\*мг білка і 1,84±0,26 пмоль/хв\*мг білка відповідно. Отже, збільшення чутливості відкриття МП до Ca<sup>2+</sup> відбувається, ймовірно, за рахунок зменшення

вироблення NO мітохондріальною ізоформою NOS, яка, згідно даних літератури, є конститутивною NOS (cNOS) [5].

Отже, можна зробити висновок, що зміна чутливості відкриття МП до кальцію відбувається саме за рахунок зменшення рівня NO в мітохондріях серця старих щурів в результаті зменшення активності cNOS. Таким чином, регуляція чутливості МП до індуктора її відкриття – Ca<sup>2+</sup> ймовірно відбувається за участю мітохондріального оксиду азоту, тобто зменшення рівня NO може бути однією з причин підвищеної чутливості відкриття МП в серці старих щурів, і певним чином впливати на зменшення резистентності мітохондріальної мембрани до індуктора відкриття МП - Ca<sup>2+</sup>.

#### Література

1. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия /

- / Биохимия. – 1985. – Т.50, №8. – С.1350-1361.
2. Коцюруба А.В., Коркач Ю.П., Рудык Е.В., Вавилова Г.Л., Сагач В.Ф. Эффективность эрдистерона как ингибитора МРТ в митохондриях сердца старых крыс; кардиопротекция путем коррекции окислительного (*de novo*) и восстановительного (*salvage*) путей синтеза NO в митохондриях // Сборник «Активные формы кислорода, азота и хлора в регуляции клеточных функций в норме и при патологии», г. Гродно, Беларусь – 2006. – ч.1 – С.157-162.
  3. Малышев И.Ю. Введение в биохимию оксида азота. Роль оксида азота в регуляции основных систем организма // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 1997. – Т.7, №1. – С.49-55.
  4. Серая И.П., Нарциссов Я.Р. Современные представления о биологической роли оксида азота // Усп. совр. биол. – 2002. – Т.122, №3. – С.249-258.
  5. Brookes P.S. Mitochondrial nitric oxide synthase // Mitochondrion – 2004. – Vol.3, №4. – P.187-204.
  6. Green D.R., Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death // Science. – 2004. – Vol.305, №5684. – P.626-629.

### Резюме

#### РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ПОВЫШЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ К ОТКРЫТИЮ КАЛЬЦИЕМ В СЕРДЦЕ СТАРЫХ КРЫС

*Вавилова Г.Л., Рудык О.В.,  
Тимошук С.В., Сагач В.Ф.*

Исследовано влияние донора NO – нитропрусида натрия (НП-Na), а также действие блокатора NO-синтазы – гидрохлорида N<sub>ω</sub>-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME) на чувствительность Ca<sup>2+</sup>- индуцируемого открытия митохондриальной поры (МП) в сердце взрослых и старых крыс.

Показано, что изменение чувствительности открытия МП к кальцию происходит именно за счет уменьшения уровня NO в митохондриях сердца старых крыс в результате уменьшения активности cNOS. Таким образом, регуляция чувствительности МП к индуктору ее открытия – Ca<sup>2+</sup> происходит, вероятно, при участии митохондриального оксида азота, то есть уменьшение уровня NO может быть одной из причин повышенной чувствительности открытия МП в сердце старых крыс, и определенным образом влиять на уменьшение резистентности митохондриальной мембраны к индуктору открытия МП - Ca<sup>2+</sup>.

### Summary

#### ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE PROMOTED SENSITIVENESS OF MITOCHONDRIAL PORE TO OPENING BY CALCIUM IN HEART OF OLD RATS

*Vavilova G.L., Rudyk O. V.,  
Tymochuk S.V., Sagach V.F.*

They have investigated influence of NO donor – sodium nitroprussid (NP-Na) and an action of NO-synthetase blockader - hydrochloride N-nitro-L-arginine of methyl ether (L-NAME) on the sensitiveness of the Ca<sup>2+</sup>- induced opening of mitochondrial pore (MP) in the heart of adult and old rats. It is shown that the change of sensitiveness of opening of MP to calcium takes place exactly due to reduction of NO level in mitochondria of old rats heart as a result of cNOS activity reduction. Thus, adjusting of MP sensitiveness to the inductor of its opening - Ca<sup>2+</sup>- takes place, probably, with participation of mitochondrial nitrogen oxide, i.e. reduction NO level can be one of the reasons of the promoted sensitiveness of MP opening in the heart of old rats, and definitely influence on reduction of mitochondrial membrane resistance to the inductor of MP opening - Ca<sup>2+</sup>.

*Впервые поступила в редакцию 18.09.2007 г.  
Рекомендована к печати на заседании ученого  
совета НИИ медицины транспорта (протокол №  
6 от 19.11.2007 г.).*