

УДК 612.014.546.174.616.12.1©

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В МОДУЛЯЦИИ ОТКРЫТИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПОР ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА

Шиманская Т.В., Добровольский Ф.В., Сагач В.Ф.

Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины, Киев

Впервые поступила в редакцию 28.09.2007 г. Рекомендована к печати на заседании ученого совета НИИ медицины транспорта (протокол № 5 от 05.10.2007 г.).

Известно, что открытие митохондриальных пор является ключевым звеном в развитии апоптоза и постреперфузионных нарушений функции сердца, тяжесть которых коррелирует со степенью изменения проницаемости митохондриальных мембран [3, 10]. Среди целого ряда агентов, влияющих на открытие митохондриальных пор (МП), особый интерес представляет оксид азота, как естественный регулятор многих физиологических процессов. Данные относительно его участия в модуляции открытия митохондриальных пор достаточно противоречивы, поскольку он может как предотвращать, так и инициировать гибель клеток [7]. Показано, что введение NO перед ишемией-реперфузией миокарда имитирует эффект „precondition” и уменьшает размеры инфаркта [4, 17]. Оксид азота способен напрямую или опосредованно взаимодействовать с митохондриями [9], связываясь с цитохромоксидазой, окисляя убихинол или взаимодействуя с супероксидом, образуя пероксинитрит, что ведет к угнетению клеточного дыхания [6, 8], либо путем окисления тиоловых групп белков приводя к открытию митохондриальных пор [5, 14]. Физиологические концентрации NO влияют на процессы инактивации каспаз посредством их S-нитрозолирования [12]. Мы предприняли попытку оценить роль оксида азота в поддержании функционального состояния сердца при ишемии-реперфузии и его участие в изменении проницаемости митохондриальных мембран.

Методы исследования

Эксперименты выполнены на изолированных сердцах морских свинок

массой 350-450 г. Перфузию коронарных сосудов осуществляли ретроградно по методу Лангендорфа при постоянном давлении 75 мм рт.ст., температуре 37°C, аэрации карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂) раствором Кребса – Хензеляйта следующего состава (в ммоль/л): NaCl - 118; KCl - 4,7; MgSO₄ - 1,2; NaHCO₃ - 24; KH₂PO₄ - 1,2; глюкоза - 10; CaCl₂ - 2,5. Давление в полости левого желудочка (развиваемое давление, Рлж), его первую производную dP/dt_{max} и dP/dt_{min} , конечно-диастолическое давление (КДД) измеряли в помощью латексного баллончика тензодатчиками 746 („Мингограф-82”, Elema, Швеция) и регистрировали на персональном компьютере с помощью программного обеспечения Global Lab. Рассчитывали индекс сократимости, интенсивность сократительной функции равной произведению Рлж на частоту сердечных сокращений (ЧСС). Величину коронарного потока определяли по объёму оттекающего от сердца перфузионного раствора за 1 мин. Напряжение кислорода в притекающем и оттекающем от сердца через легочной ствол растворе измеряли с помощью газоанализатора BMS 3 Mk 2. Кислородную стоимость работы сердца вычисляли как отношение потребления кислорода к произведению развиваемого давления на частоту сердечных сокращений. Открытие митохондриальных пор (МП) регистрировали спектрофотометрически (CF-46) по появлению в оттекающем от сердца на 1 мин реперфузии растворе митохондриального фактора, который, как показано в наших предыдущих работах [2], обуславливает характерный пик поглощения в диапазоне длины волны

230-260 нм и может служить маркером образования МП в условиях *in vivo*. Тотальную ишемию моделировали путём полного прекращения перфузии сердца в течение 20 мин. Реперфузионные изменения отслеживали на протяжении 40 мин.

Для выяснения влияния оксида азота на функциональное состояние сердца при ишемии-реперфузии в перфузионный раствор вводили (10 мин) донор NO нитропруссид Na (10^{-4} М) или блокаторы синтеза NO - L-NMMA (10^{-4} М) и амингуанидин (10^{-5} М). Для угнетения открытия митохондриальных пор использовали классический ингибитор митохондриальной проницаемости циклоспорин А (SIGMA, 10^{-6} М).

Статистическая обработка данных производилась разностным методом с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Показано, что предварительная перфузия донора оксида азота нитропруссидом Na оказывала протекторное действие на развитие реперфузионных нарушений деятельности сердца. Сердечная аритмия практически отсутствовала после возобновления потока, а степень восстановления параметров сократительной активности миокарда и кислородной стоимости работы сердца (рис. 1) через 40 минут реперфузии была существенно выше, чем в контрольной серии. При этом концентрация митохондриального фактора являющегося показателем

открытия митохондриальных пор в условиях *in situ* и *in vivo*, в оттекающем от сердца растворе снижалась, что дает нам возможность заключить, что защитное действие оксида азота на миокард при реперфузии реализовывалось как посредством улучшения функционального состояния сердца перед ишемией, так и через угнетение процесса открытия митохондриальных пор.

Блокада синтеза оксида азота как с помощью L-NMMA, так и амингуанидина (блокатора индуцибельной формы NO-синтазы, iNOS) сопровождалась снижением развиваемого давления в левом желудочке вследствие уменьшения коронарного потока. Однако, при перфузии L-NMMA наблюдались более глубокие изменения параметров кардиодинамики по сравнению с введением амингуанидина. Степень увеличения кислородной стоимости работы сердца, отражающая эффективность функционирования дыхательной цепи, также была выше (рис. 1). Это подтверждало ранее полученные нами данные [1], свидетельствующие о том, что оксид азота, синтезируемый конститутивной NO-синтазой, регулирует работу дыхательной цепи и, по-видимому, проницаемость внутренней мембраны митохондрий.

Степень реперфузионных нарушений функции сердца на фоне угнетения NO-синтаз в целом существенно не отличалась от таковой в контрольной серии (рис. 2). Однако, скорость расслабления

миокарда на 40-й минуте реперфузии на фоне блокады индуцибельной NO-синтазы с помощью амингуанидина была достоверно выше, чем в контроле. Кислородная стоимость работы сердца также увеличивалась в меньшей мере (рис. 1). Интересно отметить, что

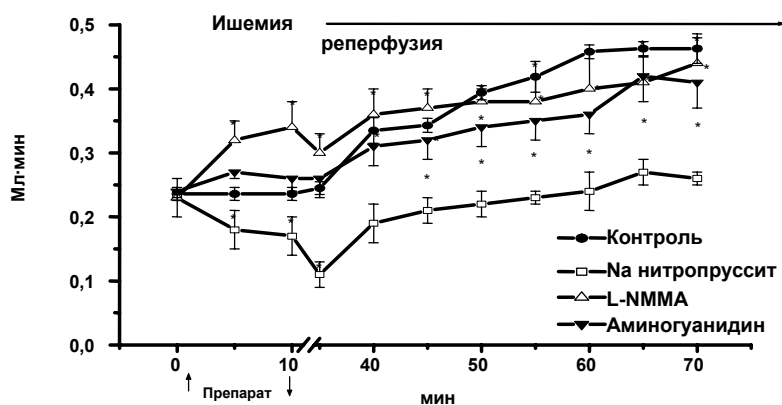


Рис. 1. Изменение кислородной стоимости работы сердца при ишемии-реперфузии (* $P < 0,05$ относительно исходной величины)

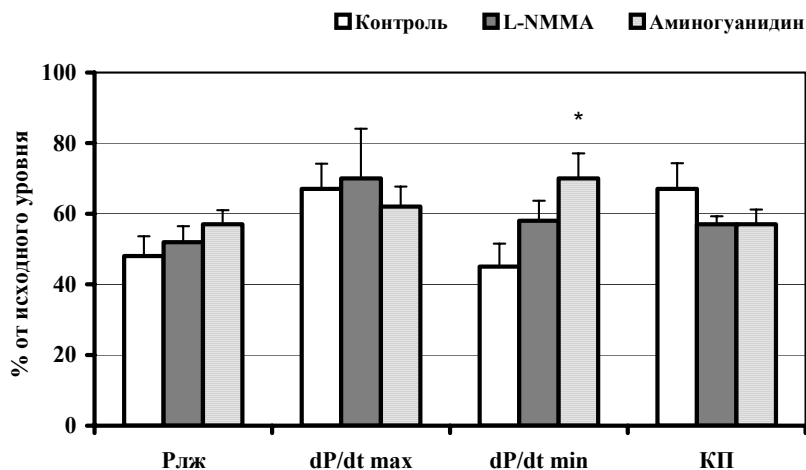


Рис. 2. Изменения показателей кардиодинамики на 40-й минуте реперфузии на фоне блокады NO-синтаз с помощью L-NMMA или аминогуанидина. $P < 0,05$ относительно контрольной серии

и количество митохондриального фактора в оттекающем от сердца растворе, отражающее открытие митохондриальных пор, уменьшалось при этом практически вдвое по сравнению с контролем.

Известно, что избыточное количество NO, продуцируемое iNOS после восстановления потока, может взаимодействовать с супероксидным радикалом, превращаться в пероксинитрит и стимулировать увеличение проницаемости митохондриальных мембран [7]. Поэтому вполне логично, что блокада индуцибельной NO-синтазы в определенной мере предотвращала открытие митохондриальных пор. Полученные факты свидетельствовали в пользу того, что оксид азота, синтезируемый именно индуцибельной NO-синтазой, через цепь биохимических превращений может способствовать открыванию митохондриальных пор.

С другой стороны, оксид азота, получаемый клеткой в результате работы конститутивной NO-синтазы и реализующий свое действие в основном посредством активации растворимой гуанилатциклазы, не только активно регулирует работу дыхательной цепи, но и, вероятно, проницаемость внутренней мембраны митохондрий. Действительно, показано, что в эндотелиальных, миокарди-

альных и других клетках оксид азота, приводящий к образованию гуанозин-3'5'-монофосфата (цГМФ), осуществляет цГМФ-зависимое угнетение открывания митохондриальных пор [11, 13, 16]. Для выяснения этого вопроса блокировали активность NO – синтазы с помощью L-NMMA после введения ингибитора образования МП циклоспорина А. Оказалось, что блокада митохондриальных пор

циклоспорином А снимала эффект воздействия L-NMMA на кислородную стоимость работы сердца (рис.3), что свидетельствовало о том, что защитный эффект оксида азота осуществляется посредством его влияния на процесс открывания митохондриальных пор.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствовали, что оксид азота активно влияет на процесс открытия митохондриальных пор и соответственно развитие реперфузионных нарушений функции сердца. Механизмы реализации его ингибирующего либо стимулирующего воздействия на открытие МП могут быть разными. С одной стороны, при введении в раствор донора NO нитропруссида Na наблюдалось угнетение образования митохондриальных пор. Это подтверждалось уменьшением количества фактора, который выделялся из митохондрий в начале реперфузии, и уменьшением постишемических нарушений функции сердца. С другой стороны, предварительная блокада индуцибельной формы NO-синтазы также в определенной степени ограничивала образование МП при ишемии-реперфузии, что свидетельствовало в пользу участия оксида азота, синтезируемого iNOS, или продуктов его превращения в процессах стимуляции открывания митохондриаль-

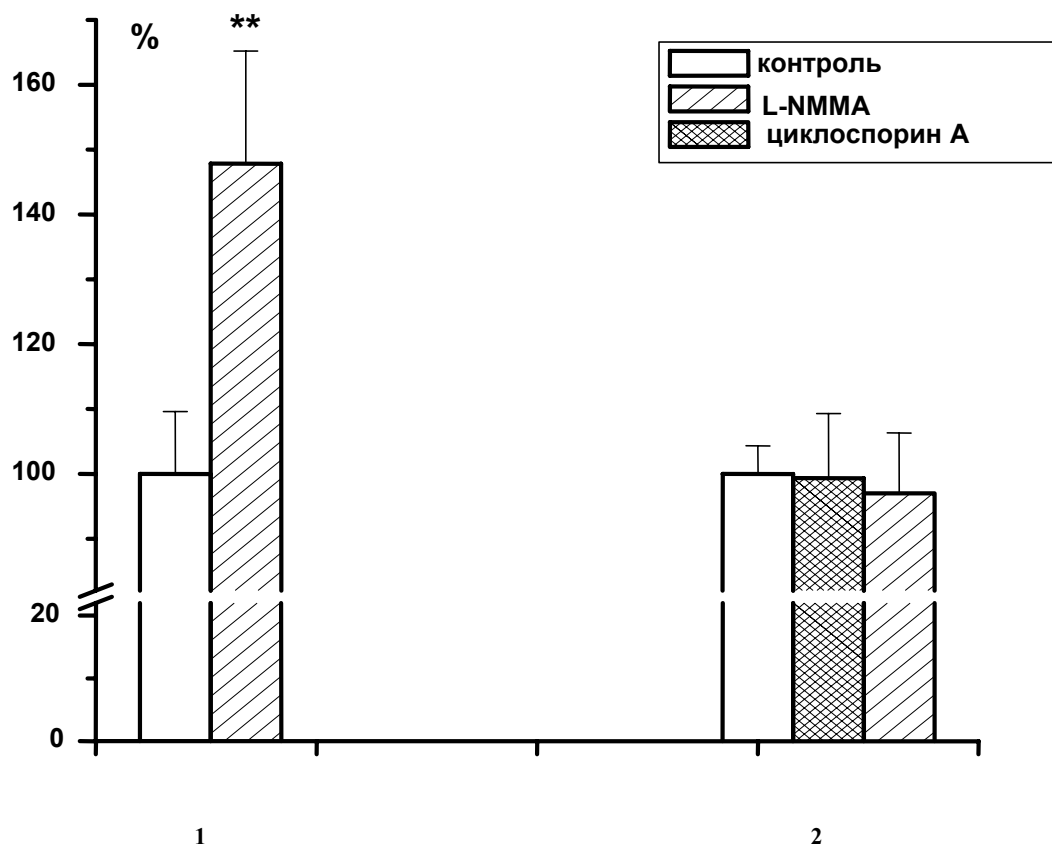


Рис. 3. Влияние блокады синтеза NO на кислородную стоимость работы сердца в контрольных условиях (1) и после введения циклоспорина А (2).
 ** $P < 0,01$ относительно контроля

ных пор.

Механизм влияния NO на проницаемость мембран остается до конца не выясненным и требует дальнейших исследований. Результаты наших исследований согласуются с данными, полученными в экспериментах на изолированных митохондриях: показано, что влияние NO на МП имеет дозозависимый характер: концентрации NO в пределах от 10 нМ до 1 мкМ, которые в физиологических условиях синтезируются конститутивными формами NO-синтазы, в первую очередь эндотелиальной, угнетают образование митохондриальных пор [7].

При малых концентрациях оксид азота играет важную регуляторную роль во многих физиологических процессах. Кроме участия в регуляции давления и расслаблении сосудистых гладких мышц, NO действует непосредственно на митохондриальное дыхание [18], его ингибирующее влияние на дыхательные фер-

менты митохондрий также может быть одной из причин снижения кислородной стоимости работы сердца [1]. Более того, существует представление, что блокада поры под действием NO объясняется именно ингибированием цитохромоксидазы [3].

Большие концентрации оксида азота, более 20 мкМ, имеют противоположный эффект – угнетение синтеза АТФ и нитрозолирование тиоловых (-SH) групп митохондриальных белков ведут к открыванию митохондриальных пор [5, 14, 15]. Как известно, увеличение уровня свободного оксида азота в клетках в несколько раз может быть вызвано активацией индуцибельной формы NO-синтазы, что имеет место и при реперфузии сердца. При этом молекула оксида азота взаимодействует с супероксидом (O_2^-), гиперпродукция которого происходит именно при реперфузии, образуя мощный оксидант – пероксинитрит (ONOO), который

в свою очередь через окисление тиоловых групп белков может приводить к открыванию митохондриальных пор [8, 15]. В пользу этого факта свидетельствовало то, что добавление дитиотреитола (ДТТ), известного восстановителя (-SH)-групп, в суспензию митохондрий блокировало образование МП под действием больших концентраций NO [14]. В наших экспериментах на изолированном сердце морских свинок предварительное введение ДТТ предотвращало выделение митохондриального фактора в начале реперфузии сердца [2].

Два противоположных эффекта оксида азота на активацию митохондриальных пор при реперфузии вероятно обусловлены природой самой молекулы. С одной стороны, она может выступать как свободный радикал, который способен нитрозолировать тиоловые группы белков и тем самым вызывать открытие митохондриальных пор. С другой стороны, безусловно, оксид азота является не самым эффективным, но, вероятно, наиболее естественным ингибитором митохондриальных пор, проявляя активность в концентрациях, обеспечиваемых эндотелиальными клетками и кардиомиоцитами.

Литература

1. 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 - 40.
2. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття митохондриальної пори // Фізіол. ж.- 2003.- 49, №4.- С.6-12.
3. Balakirev M.Y., Khramtsov V.V., Zimmer G. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide / Eur. J Biochem. - 1997. - 246, № 3. - P. 710 - 718.
4. Bolli R., Bhatti Z.A., Tang X.L. et al. Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide//Circ Res.- 1997.- 81,№ 1. - P.42-52.
5. Borutaite V., Morkuniene R., Brown G.C. Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms // FEBS Lett. - 2000. - 467, № 2-3. - P. 155 - 159.
6. Brookes P.S. Mitochondrial nitric oxide synthase // Mitochondrion. - 2004. - 3, № 4. - P. 187 - 204.
7. Brookes P.S., Salinas E.P., Darley-Usmar K. et al. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release // J Biol. Chem. - 2000. - 275, № 27. - P. 20474 - 20479.
8. Brown G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration // Biochim. Biophys. Acta - 1999. - 1411, № 2-3. - P. 351 - 369.
9. Brown G.C., Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death // Free Radic. Biol. Med. - 2002. - 33, № 11. - P. 1440 - 1450.
10. Crompton M., Andreeva L. On the involvement of a mitochondrial pore in reperfusion injury // Basic Res. Cardiol. - 1993. - 88, № 5. - P. 513 - 523.
11. Kim J.S., Ohshima S., Padiaditakis P., Lemasters J.J. Nitric oxide protects rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition // Hepatology - 2004. - 39, № 6. - P. 1533 - 1543.
12. Kim Y.M., Talanian R.V., Billiar T.R. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms//J Biol. Chem.-1997.-272,№ 49.-P.31138-31148.
13. Nisoli E., Clementi E., Paolucci C. et al. Mitochondrial biogenesis in mammals:

- the role of endogenous nitric oxide // Science - 2003. - 299, № 5608. - P. 896 - 899.
14. Piantadosi C.A., Tatro L.G., Whorton A.R. Nitric oxide and differential effects of ATP on mitochondrial permeability transition // Nitric. Oxide. - 2002. - 6, № 1. - P. 45 - 60.
 15. Scarlett J.L., Packer M.A., Porteous C.M., Murphy M.P. Alterations to glutathione and nicotinamide nucleotides during the mitochondrial permeability transition induced by peroxynitrite // Biochem. Pharmacol. - 1996. - 52, № 7. - P. 1047 - 1055.
 16. Takuma K., Phuagphong P., Lee E. et al. Anti-apoptotic effect of cGMP in cultured astrocytes: inhibition by cGMP-dependent protein kinase of mitochondrial permeable transition pore // J Biol. Chem. - 2001. - 276, № 51. - P. 48093 - 48099.
 17. Wang G, Liem DA, Vondriska TM, et al. Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction via modulation of mitochondrial permeability transition. //Am J Physiol Heart Circ Physiol.- 2005.- 288, №3.- P.H1290-H1295.
 18. Xie Y.W., Shen W., Zhao G. et al. Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro. Implications for the development of heart failure // Circ Res. - 1996. - 79, № 3. - P. 381 - 387.

Резюме

РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ В МОДУЛЯЦІЇ
ВІДКРИТТЯ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ ПОР
ПРИ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ
ІЗОЛЬОВАНОГО СЕРЦЯ

*Шиманська Т.В., Добровольський Ф.В.,
Сагач В.Ф.*

Показано, що попередня перфузія донора оксиду азоту нітропрусида Na проявляла протекторну дію на розвиток

реперфузійних порушень діяльності серця. Серцева аритмія практично була відсутня після відновлення потоку, а ступінь відновлення параметрів скорочувальної активності міокарду і кисневої вартості роботи серця через 40 хвилин реперфузії був істотно вище, ніж в контрольній серії. При цьому концентрація мітохондріального фактора, що є показником відкриття мітохондріальних пор в умовах *in situ* і *in vivo*, в розчині, що відтікав від серця, знижувалася, що дає можливість укласти, що захисна дія оксиду азоту на міокард при реперфузії реалізовувалася як за допомогою поліпшення функціонального полягання серця перед ішемією, так і через пригнічення процесу відкриття мітохондріальних пір.

Summary

ROLE OF NITROGEN OXIDE IN
MODULATION OF OPENING OF
MITOCHONDRIAL PORES AT ISCHEMIC-
REPERFUSION OF AN ISOLATED HEART

*Shimanskaya T.V., Dobrovolskiy F.V.,
Sagach V.F.*

It is shown that preliminary perfusion of oxide donor of nitroprussid Na rendered a protector action on development of reperfusion violations of cardiac activity. Cardiac arrhythmia was practically absent after renewal of the stream, and the degree of renewal of parameters of recovery activity of myocardium and oxygen labour costs of heart in 40 minutes of perfusion was substantially higher, than in control series. Concentration of mitochondrial factor being the index of opening of mitochondrial pores in the conditions of *in situ* and *in vivo* in solution flowing back from a heart went down, that enables us to conclude that protective action of myocardium nitrogen oxide at reperfusion was realized both by means of improvement of the functional state of the heart before ischemia and through oppression of process of opening of mitochondrial pores.