

УДК 612.014.546.174.591.412

УЧАСТЬ NO В РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ПОРИ

Дмитрієва А.В., Сагач В.Ф., Бубнова Ю.О., Богуславський А.Ю.

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця, Київ, Україна

Вступ

На сьогоднішній день величезна кількість наукових робіт, присвячених вивченню ролі NO в регуляції різних функцій організму і клітин, не стає на заваді появи нових сторін його дії. На теперішній час відомо, що однією з важливих ролей NO є паракринна фізіологічна регуляція клітинного дихання та енергоутворення [7, 10, 11]. В ряді робіт показано, що NO може модулювати чутливість мітохондріальної пори (МП) до її активаторів. [6, 11]. Проте дані, отримані на цей час, є досить суперечливими та недостатніми для розуміння процесів, що відбуваються. Так велика концентрація NO, яку забезпечує активація індукційної NO-синтази може бути патогенетичним фактором розвитку судинного колапсу, а з іншого боку недостатня кількість NO, що пов'язана зі зменшенням кількості і активності конституційних форм NO-синтаз, обумовлює розвиток судинних патологій при старінні, діабеті, атеросклерозі та інш. Саме тому, дослідження впливу NO на мітохондріальні функції та функціональний стан клітин залишаються актуальними.

Метою нашої роботи стало дослідити участь NO в регуляції активності МП, вплив активації та пригнічення мітохондріальної пори на скорочувальну функцію міокарда і судин в різних граничних станах.

Методика

Експерименти проводили на ізольованих міокардіальних трабекулах (МТ) з вушка правого передсердя і кільцевих смужок із сонної артерії (АС) морських свинок масою 350-450 г. Термостатована, двохкамерна установка давала можливість як послідовної, так і ізольованої

перфузії досліджуваних препаратів сольовим розчином Кребса-Хензелята при температурі 29-31°C. В експериментах використовували синхронну та послідовну електричну стимуляцію ізольованих препаратів з такими параметрами: 5 Гц, 50 мс, 30 В. [2]. Перфузійний розчин, що відтікав від ізольованого за Лангендорфом серця, збирали за перші 5 хвилин реперфузії і перфузували їм МТ і судинні смужки. Оксидативний стрес для міокарда моделювали за допомогою інкубації міокардіальної трабекули в розчині активатора МП феніларсиноксиду (ФАО, 10⁻⁵ М/л) протягом 2-3 хв [9]. Інтервальне гіпоксичне тренування (ІГТ) старих тварин проводили протягом 7 днів за схемою: п'ять періодів гіпоксичного впливу тривалістю 15 хвилин кожний, і нормоксичні інтервали між ними, тривалість яких становила також 15 хвилин. Вміст кисню в повітряній суміші складав 12%. Статистичну обробку даних проводили різницевою методикою і за допомогою критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Під час 2-хв. перфузії попередньо активованих ізольованих препаратів розчином, який був зібраний за перші 5 хв реперфузії ішемізованого ізольованого серця, визначалося значне падіння тонічної напруги як МТ, так і АС на 2,36 мН ± 0,3 мН і 2,24 мН ± 0,32 мН, відповідно. Різко пригнічувалися скорочувальні реакції препаратів у відповідь на тестову послідовну електричну стимуляцію. МТ підвищувала тонічну напругу тільки на 1,13 мН ± 0,35 мН, а АС - на 0,97 мН ± 0,27 мН, що на 68% (p<0,001) та 12%, відповідно, менше скорочувальної відповіді в контрольних умовах. В дослідженнях, на ізольованих

мітохондріях, ізольованому серці та на цілому організмі встановлено, що під час активації МП з пошкодженого міокарда вивільнюється стабільний мітохондріальний фактор (МФ), концентрація якого тісно корелює зі ступенем пригнічення функції серця та розслабленням АС [3,4,5]. В попередніх експериментах було з'ясовано, що дія індуктора відкриття МП ФАО є дозозалежною. Так реперфузія інкубованої з ФАО (10^{-5} Моль/л) впродовж 2 хв. МТ призводила до глибокого падіння тонічної напруги обох препаратів на $8,7 \text{ мН} \pm 2 \text{ мН}$ і $5,92 \text{ мН} \pm 0,89 \text{ мН}$, відповідно. Така реакція була якісно аналогічною до зареєстрованої під впливом розчину, що відтікав від ішемізованого серця. При цьому розслаблення, викликане дією ФАО, було більшим, ніж викликане розчином, відтікаючим від ішемізованого серця. Це можна пояснити прямим ушкодженням ФАО МТ [8]. Пригнічення реакцій ізольованих суперфузованих препаратів на електричну стимуляцію після дії активатора МП на МТ було майже повним, тонічна напруга МТ збільшувалася лише на $0,13 \text{ мН} \pm 0,19 \text{ мН}$. В той же час АС скорочувалася на $2,33 \text{ мН} \pm 0,58 \text{ мН}$. В подальших експериментах ми користувались середньою дозою ФАО - 5×10^{-6} Моль/л, яка давала виразний дилататорний ефект, але не пригнічувала повністю скорочувальну активність МТ. Реперфузія інкубованої з ФАО (5×10^{-6} Моль/л) МТ супроводжувалась падінням тонічної напруги як самої трабекули (на $3,82 \pm 0,4 \text{ мН}$), так і АС (на $2,8 \pm 0,36 \text{ мН}$). Таким чином, ми одержали модель, що легко відтворює ушкодження міокарда, яке спричиняє активація МП, і реакцію на це периферичних судин під час реперфузії пошкодженої МТ.

Як відомо, ряд біологічно активних речовин і, перед усім NO, здійснюють розслаблюючу дію через активацію розчинної гуанілатциклази [1]. В наступній серії дослідів ми досліджували можливість присутності NO в складі МФ. Під час

реперфузії інкубованих з ФАО МТ розчином з інгібітором розчинної гуанілатциклази метиленовим синім (10^{-4} Моль/л), реєструвалось зниження тонічної напруги МТ і АС на $2,5 \pm 0,35 \text{ мН}$ та $1,7 \pm 0,3 \text{ мН}$, відповідно, що було достовірно менше, ніж у контрольних умовах. Послаблення дилататорного впливу МФ під впливом метиленового синього може свідчити про те, що в складі фактора може бути NO-вмісний компонент [19]. Послідовна 10-хвилинна перфузія пошкоджених препаратів з нітрозоглутатіоном (10^{-5} М/л) повністю відновлювала скорочувальні реакції МТ і АС на електричну стимуляцію. Тонічне напруження МТ збільшувалось на $3,76 \text{ мН} \pm 0,4 \text{ мН}$, а АС - на $2,3 \text{ мН} \pm 0,15 \text{ мН}$ ($P < 0,001$), з відновленням модулюючого впливу розчину, який відтікав від міокардіальної трабекули, на скорочувальну реакцію артеріальної смужки. Тобто відновлення рівня NO-вмісних структур в МТ сприяє підвищенню скорочувальної активності препарату.

Як відомо, з віком в організмі зменшуються адаптаційні можливості, вповільнюються процеси метаболізму клітин, та інш. Натомість старі клітини стають значно чутливішими до дії негативних чинників, які обумовлюють та/або полегшують відкриття мітохондріальної пори. Це може відбуватися за рахунок зменшення кількості або зниження активності конституційних ізоформ NO-синтаз, а також зменшення кількості тіолів, що обмежує можливості клітини акумулювати та транспортувати оксид азоту [8]. З останніх наукових публікацій відомо, що гіпоксичне та ішемічне прекодиціювання здійснює стимуляторну дію на конститутивні ізоформи NO-синтаз в міокарді [6]. Тому в наступній серії експериментів ми дослідили вплив ІГТ на чутливість МП до дії її активаторів у старих тварин. У старих тварин значно зростав розслаблюючий ефект ФАО на МТ, тонічна напруга якої знижувалась на 190%, по відношенню до контрольних величин. При цьому ди-

лататорний вплив відтікаючого від реперфузованої МТ розчину на АС збільшувався тільки на 11 %. Також в цьому випадку істотно не відрізнялись від контрольних скорочувальні відповіді ізольованих препаратів на тестову електричну стимуляцію. Тобто, МТ старих тварин значно чутливіша до пошкоджуючої дії ФАО. В групі старих тварин з ІГТ дилататорна дія ФАО на МТ збільшувалась на 148%, що вірогідно менше, ніж у нетренованої групи, а тонічна напруга артеріальної смужки збільшилась на 12,5%. Показники тонічного напруження обох ізольованих препаратів в умовах тестової електричної стимуляції були вірогідно вищі за контрольні. Таким чином, гіпоксичне прекодиціювання у старих тварин справляє позитивний вплив на функціональний стан серцево-судинної системи і зменшує чутливість МП міокарда до дії індукторів її відкриття. Попередня перфузія ізольованих препаратів старих тварин розчином з донором NO - На нітропрусиду (НП, 10^{-5} М/л) справляла дію, яка була подібною до впливу гіпоксичного прекодиціювання. Розслаблююча дія ФАО на МТ в цій серії дослідів була більшою за контрольну тільки на 113% ($p > 0,01$), а ділататорний вплив відтікаючого розчину від трабекули на АС збільшувався на 7%. Також в цих умовах відбувалось збільшення скорочувальних відповідей на контрольну стимуляцію як МТ на 41%, так і АС на 3,6%. Наведені дані свідчать про протекторну дію NO на міокард і артеріальні судини старих тварин за рахунок зменшення чутливості МП міокарда до дії індукторів її відкриття. У старих тварин з ІГТ попередня перфузія ізольованих препаратів розчином з НП дещо збільшувала негативний вплив ФАО на міокардіальну трабекули на 156% і вірогідно збільшувала ділататорний ефект відтікаючого від трабекули розчину на артеріальну смужку на 52%. Скорочувальні відповіді ізольованих препаратів на контрольну електричну стимуляцію були майже вдвічі нижчи-

ми від групи старих нетренованих тварин. Тобто в цих умовах протекторного впливу донору NO на міокард не відбувалось. Цей факт можна розцінювати як свідчення про вичерпання внутрішніх ресурсів міокарду під час тренування старих тварин.

Таким чином, оксидативний стрес мітохондріального походження приймає активну участь у розвитку порушень скорочувальної функції міокарда в умовах ішемії/реперфузії, та при старінні, що збігається з результатами отриманими іншими авторами [7,11]. Мітохондрії і потім ушкоджена оксидативним стресом сарколема можуть бути основними джерелами NO -сполук, можливо нітрозоглутатіона [10], який здатний бути основним діючим компонентом мітохондріального фактора. Нашою роботою продемонстровано, що NO приймає активну участь в регуляції чутливості МП до дії індукторів її відкриття. Гіпоксичне прекодиціювання у старих тварин справляє позитивний вплив на функціональний стан серцево-судинної системи і зменшує чутливість МП міокардіальних препаратів. В той же час попередня перфузія ізольованих препаратів розчином з НП зменшувала ефект гіпоксичного тренування старих тварин, що можна пояснити вичерпанням внутрішніх ресурсів міокарду при ІГТ. Використання донорів NO продемонструвало протекторну дію на міокард і артеріальні судини старих тварин за рахунок зменшення чутливості МП міокарда до дії індукторів її відкриття. Найкраще відновлення скорочувальної активності ізольованих препаратів відбувалось під час перфузії пошкоджених препаратів з нітрозоглутатіоном та при гіпоксичному прекодиціюванні. Тут особливу увагу потрібно звернути на відновлення модулюючого впливу розчину, який відтікав від міокардіальної трабекули, на скорочувальну реакцію артеріальної смужки. Такі натуральні стимуляції сприяють вивільненню NO в клітинному середовищі в

присутності специфічних ферментів, які забезпечують транснаїтрозування, пряме нітрозування, яке модулює активність мітохондріального комплексу I [8]. Отже наші дослідження показали, що донори NO можуть бути ефективно використані як геропротектори, а також з метою профілактики оксидативних пошкоджень міокарда, обумовлених дією факторів, що призводять до утворення та відкриття мітохондріальної пори.

Література

1. Дмитрієва А.В., Сагач В.Ф., Богуславський А.Ю. Оксидативний стрес мітохондріального походження: вплив на функцію ендотелія та судинну реактивність// Труды III Міжнародної науково-практичної конференції "Дисфункція ендотелія", Вітебськ. - 2004. - С.4- 7.
2. Жукова А. В. Модулюючий вплив ендотеліального релаксуючого фактора на реактивність міокарда та артеріальних судинних смужок// Фізіол. журн. 1999.- **45**, № 1-2.- С. 64-72.
3. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Акопова О.В. Вплив індукторів та інгібіторів мітохондріальної пори на її утворення та на вивільнення неіндентифікованого мітохондріального фактора. // Фізіол. журн.- 2003.- 49, №1.- С.3-12.
4. Сагач В.Ф., Дмитрієва А.В., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, дослідження впливу на міокард, коронарні та периферичні судини // Фізіол. журн.- 2002.- 48, №1.- С.3-8.
5. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори. // Фізіол. журн.- 2003.- 49, № 4.- С. 7-13.
6. Bolli R., Bhatti Z.A., Tang X.L., Qiu Y.M. Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits triggered by the generation of nitric oxide// *Circulat.Res.*- 1997.- **81**, N 1.- P.42-52.
7. Borutaite V., Jekabsone A., Morkuniene R., Brown G.C. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevent mitochondrial dysfunction, cytochrom c release and apoptosis inuced by heart ischemia // *J.Mol. Cell.Cardiol.*- 2003.- 35.-P. 357-366.
8. Burwell L.S., Nadtochiy S.M., Tompkins A.J., Brooks P.S Direct evidens for S-nitrosation of mitochondrial complex I // *Biochem.J.* – 2006.-394.-P.627-634
9. Korge P., Goldhaber J.I., Weiss J.N. Phenylarsine oxide induced mitochondrial permeability transition, hypercontracture, and cardiac cell death// *Am. J. Physiol.* - 2001.- **280**.- P.H2203-H2213.
10. Mayer B., Pfeiffer S., Schrammel A., Koesling D., Schmidt K., Brunner F. A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrisoglutatione. // *J. Biol. Chem.*- 1998.- 273, N6.- P.3264-3270.
11. Sastre J., Pallardo F.V., Vina J. Mitochondrial oxidative stress play a key role in aging and apoptosis// *Life.*- 2000.- **49**.- P. 427-435.

Резюме

УЧАСТИЕ NO В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ

Дмитриева А.В., Сагач В.Ф., Бубнова Ю.О., Богуславский А.Ю.

Продемонстрировано, что NO принимает активное участие в регуляции чувствительности митохондриальной поры (МП) к действию индукторов ее открытия. Гипоксическое preconditionирование у старых животных оказывает позитивное влияние на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы и уменьшает чувствительность МП

миокардиальных препаратов. В то же время предварительная перфузия изолированных препаратов раствором с Na-нитропруссидом уменьшала эффект гипоксической тренировки старых животных, что можно объяснить истощением внутренних ресурсов миокарда при интервальной гипоксической тренировке. Использование доноров NO продемонстрировало протекторное действие на миокард и артериальные сосуды старых животных за счет уменьшения чувствительности МП миокарда к действию индукторов ее открытия. Наилучшее восстановление сократительной активности изолированных препаратов происходило во время перфузии поврежденных препаратов с нитрозоглютационом и при гипоксическом preconditionировании. Здесь особенное внимание нужно обратить на восстановление модулирующего влияния раствора, который оттекает от миокардиальной трабекулы, на сократительную реакцию артериальной полоски. Такие натуральные стимуляции способствуют высвобождению NO в клеточной среде в присутствии специфических ферментов, которые обеспечивают транснаитрозолирование, прямое нитрозолирование, которое модулирует активность митохондриального комплекса I. Исследования показали, что доноры NO могут быть эффективно использованы как геропротекторы, а также с целью профилактики оксидативных повреждений миокарда, обусловленных действием факторов, которые приводят к образованию и открытию митохондриальной поры.

Summary

NO PARTICIPATION IN THE REGULATION OF MITOCHONDRIAL PORE ACTIVITY

*Dmitriyeva A.V., Sagach V. F.,
Bubnova Yu.O., Boguslavskiy A. Yu.*

It is shown, that NO takes an active part in adjusting of sensitiveness of mitochondrial pore (MP) to the action of inductors of its opening. Hypoxic

preconditioning at old animals has a positive influence on the functional state of cardio-vascular system and diminishes sensitiveness of MP of myocardial preparations. At the same time preliminary perfusion of the isolated preparations by the solution with Na-nitroprusside diminished the effect of hypoxic training of old animals. Later may be explained by exhausting of myocardium internal resources at the interval hypoxic training. The use of NO donors showed protective action on myocardium and arterial vessels of old animals due to reduction of MP sensitiveness to the action of inductors of its opening. The best renewal of retractive activity of the isolated preparations took place during perfusion of the damaged preparations with nitrosoglutatione and at hypoxic preconditioning. The special attention should be paid to renewal of the solution modulating influence which flew back from myocardial trabecular, on the contractile reaction of arterial strip. Such natural stimulations are instrumental in the NO releasing in a cellular environment in the presence of specific enzymes which provide trans-mitochondrial, direct nitrosolation, which modulates activity of the mitochondrial complex I. The researches done showed that NO donors may be effectively used as geroprotectors, and with the purpose of prophylaxis of the oxidative damages of myocardium, conditioned by the action of factors which result in formation and opening of mitochondrial pore.

*Впервые поступила в редакцию 11.09.2007 г.
Рекомендована к печати на заседании ученого
совета НИИ медицины транспорта (протокол №
6 от 19.11.2007 г.).*