

О. Ю. Гарматіна, В. І. Азаров, О. О. Мойбенко

Вплив донора оксиду азоту SIN-1 на кальційтранспортну функцію саркоплазматичного ретикулула серця щура

Исследовано влияние продуктов неферментативного распада SIN-1 (оксида азота, супероксидного аниона и пероксинитрита) на транспорт Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулулом гомогената сердца крысы. Показано, что SIN-1 (30 мкмоль/л) оказывает выраженное активирующее влияние на риаodinчувствительные кальциевые каналы, вызывая трехкратное увеличение скорости выхода кальция через них. Такое действие SIN-1 осуществляется в основном за счет действия оксида азота и частично - супероксидного радикала. SIN-1 не влияет на активность Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулула.

ВСТУП

Незважаючи на те, що вплив оксиду азоту на внутрішньоклітинну концентрацію кальцію вивчається вже давно, це питання остаточно не з'ясоване. Показано, що викид Ca^{2+} через кальційвивільняючі канали (ріанодинові рецептори) може збільшуватися під дією газоподібного NO і нітрозотіолів [16]. З іншого боку відомо, що високі дози оксиду азоту можуть зменшувати активність кальційвивільняючих каналів [10, 18]. Що стосується впливу оксиду азоту на активний транспорт Ca^{2+} саркоплазматичним ретикулулом (СР), то отримані на різних об'єктах дані свідчать як про можливість активації Ca^{2+} -насоса СР [2], так і його інгібування [5, 17]. Тому метою нашої роботи було з'ясування характеру і механізмів впливу NO на транспорт Ca^{2+} СР.

Звичайно дослідження ролі оксиду азоту на функції клітини проводяться за допомогою так званих донорів NO (SIN-1, SNAP тощо), або активацією синтезу NO за допомогою L-аргініну або його інгібуванням за допомогою блокаторів нітрооксидсинтаз. У нашому дослідженні як донор NO ми вико-

ридали SIN-1 (30 мкмоль/л), вплив якого на функцію СР досліджений недостатньо. Показано, що при такій концентрації при неензиматичному розпаді SIN-1 (при рН 7,4, 37°C) у буферному розчині утворюється близько 1 мкмоль/л NO за хвилину [7]. При аналізі ефектів, що отримуються за допомогою донорів NO, потрібно враховувати можливість утворення і інших субстанцій, зокрема супероксиданіона ($\cdot O_2^-$) і пероксинітрити ($ONOO^-$), що є високоактивними метаболітами. Для вичленення їх ефектів використовувалися відповідні блокатори.

МЕТОДИКА

Ми вивчали транспорт Ca^{2+} у гомогенатах міокарда щурів [9, 15]. У деяких випадках, наприклад, при дослідженнях обміну кальцію при ішемії і реперфузії міокарда, можуть бути певні переваги такого методу перед іншими, які пов'язані з фракціонуванням гомогенату [3, 14].

Приготування гомогенатів серця. Щурів масою 250 - 300 г анестезували уретаном (140-160 мг/100 г) за 10 хв до вилучення

серця. Грудну порожнину відкривали на рівні з'єднання груднини і ребер. Серця швидко видаляли і вміщували в холодний фізіологічний розчин. Після видалення передсердь, великих судин і правого шлуночка лівий шлуночок зважували і гомогенізували в десятиразовому об'ємі середовища, що містить 10 ммоль/л тріс-НСІ, рН 7,4, за допомогою гомогенізатора Поттера (тефлон-скло) при 1000 об/хв 20 проходами пестика. Протягом експерименту гомогенати тримали на льоду.

Вимірювання швидкості транспорту Ca^{2+} , що підтримується оксалатом. У гомогенатах міокарда поглинання Ca^{2+} відбувається, головним чином, везикулами СР і мітохондріями, активність останніх може бути ефективно блокована азидом натрію [13].

Швидкість транспорту Ca^{2+} при наявності оксалату вимірювали кальційселективним електродом (фірма "Orion", США) в камері, яка термостатується при 37°C, при постійному перемішуванні в середовищі інкубації, що містить (в ммоль/л) КСІ - 100, MgCl_2 - 6, азид натрію - 10, оксалат калію - 10, АТФ - 2. Швидкість транспорту кальцію вимірювали при блокаді і без блокади кальційвивільняючих каналів рутенієвим червоним (25 мкмоль/л). Реакцію запускали додаванням АТФ. Вимірювали максимальну швидкість транспорту кальцію при блокаді і без блокади. Проведено чотири серії експериментів: I – контрольна, II – додавання рутенію червоного для блокування кальційвивільняючих каналів, III – SIN-1, IV – SIN-1 і рутенієвий червоний. Швидкість транспорту Ca^{2+} везикулами СР виражали в мікромолях Ca^{2+} за 1 хв на 1 г тканини серця.

Вимірювання швидкості транспорту Ca^{2+} при наявності донора NO. Як донор NO використовувався 3-морфоліносидномінін (SIN-1, фірма «Sigma», США). Показано [7], що до початку розпаду SIN-1 існує лаг - фаза, яка дорівнює 5-7 хв. Тому перед запуском транспорту Ca^{2+} за допомогою АТФ, гомогенат у середовищі інкубації передінкубували з SIN-1 (30 мкмоль/л) протягом 5 хв (час, достатній до початку власного роз-

паду препарату). При розпаді SIN-1, одночасно з утворенням NO, утворюється також еквімолярна кількість $\cdot\text{O}_2^-$ (з подальшим утворенням пероксинітрити) [7]. Щоб розділити дію цих продуктів розпаду SIN-1 на швидкість транспорту кальцію СР, у гомогенатах міокарда щура було виконано додатково дві серії експериментів: V - з L-метионіном (20 ммоль/л) - ефективним скавенжером пероксинітрити; VI - з супероксиддисмутазою (СОД, 100 од, фірма «Sigma», США) - скавенжером $\cdot\text{O}_2^-$.

Отримані результати оброблялися статистично з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У СР поглинання Ca^{2+} здійснюється Ca^{2+} -АТФазою, в той час як вихід Ca^{2+} з СР відбувається, в основному, через ріанодинчутливі кальцієві канали. Реальна швидкість транспорту Ca^{2+} є балансом між входом Ca^{2+} у везикули СР і його виходом з них [1]. Блокування ріанодинчутливих кальцієвих каналів рутенієвим червоним дозволяє реєструвати тільки вхід кальцію у везикули і виявити реальну (наскільки це можливо за умов нашого експерименту) активність Ca^{2+} -АТФази (рис. 1). У наших експериментах рутенієвий червоний спричиняв збільшення швидкості транспорту на 110% (з $5,2 \pm 0,5$ у контролі до $10,9$ мкмоль $\cdot \text{Ca}^{2+}$ хв⁻¹ \cdot г⁻¹ $\pm 0,9$ мкмоль $\cdot \text{Ca}^{2+}$ хв⁻¹ \cdot г⁻¹; $P < 0,05$, $n=6$) (рис. 2). Таким чином, вихід кальцію через ріанодинчутливі кальцієві канали знижує вдвічі реальну швидкість транспорту кальцію Ca^{2+} -АТФазою (див. рис. 2).

Оскільки до початку розпаду SIN-1 існує лаг - фаза [7], то вимірюючи швидкість транспорту кальцію СР без передінкубації гомогенату з SIN-1 за перші хвилини після його додавання в середовище інкубації з гомогенатом, можна було судити про дію самого препарату на процес транспорту кальцію. У наших експериментах SIN-1 без передінкубації з гомогенатом не впливав на швидкість

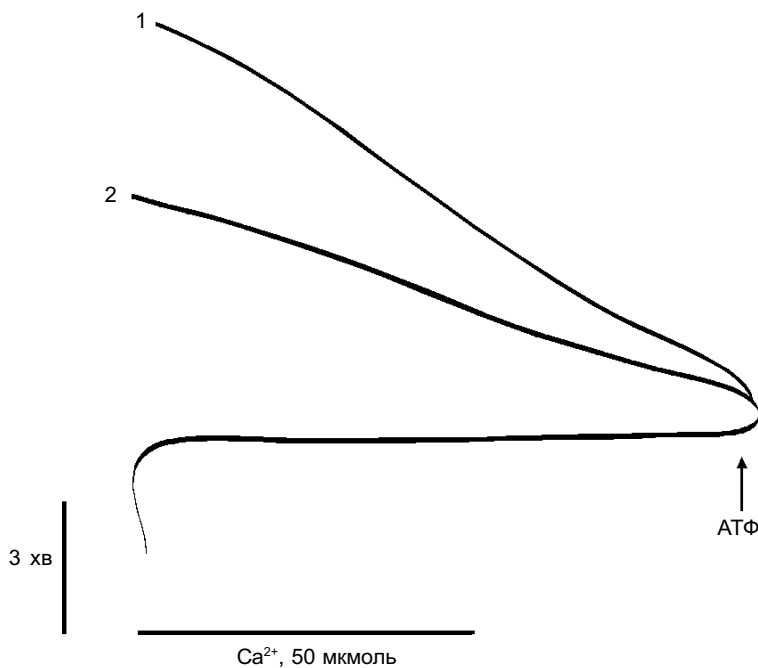


Рис. 1. Швидкість транспорту Ca^{2+} везикулами саркоплазматичного ретикулума гомогенату серця щура в контролі (1) і при наявності 25 мкмоль/л рутенієвого червоного (2).

транспорту Ca^{2+} СР. Водночас після передінкубації протягом 5 хв відбувалося зниження швидкості транспорту кальцію до $0,7 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \pm 0,06 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ ($P < 0,05$; $n=6$) (рис. 2). Цей ефект зникав після блокади кальцій-вивільняючих каналів рутенієвим червоним. Швидкість поглинання кальцію СР достовірно не відрізнялася від контрольних значень з рутенієвим червоним SIN-1 (рис. 2). На основі цього можна зробити висновок, що продукти розпаду SIN-1 (оксид азоту, супероксидний радикал і пероксинітрит) не впливають істотно на активність Ca^{2+} -АТФази СР, але значно збільшують швидкість виходу Ca^{2+} з везикул СР через ріанодинчутливі кальцієві канали (більш ніж утричі).

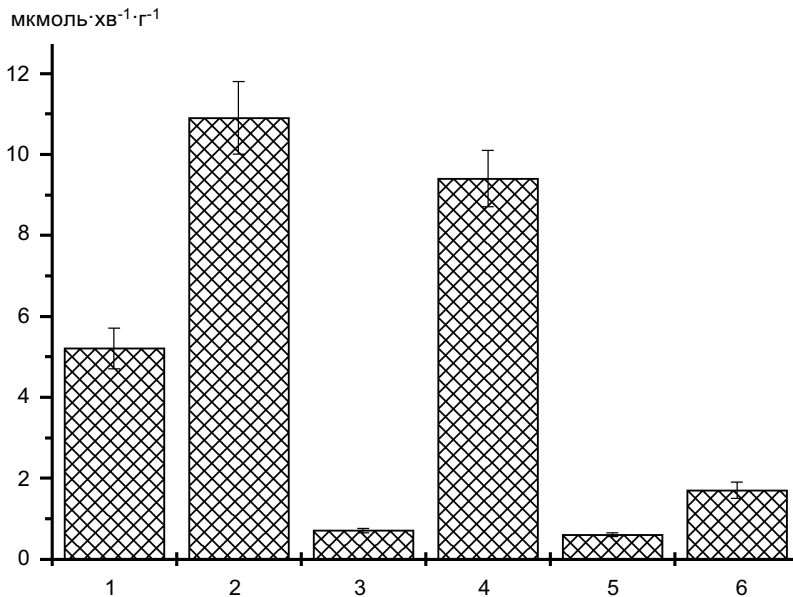


Рис. 2. Вплив продуктів розпаду SIN-1 на швидкість транспорту Ca^{2+} саркоплазматичним ретикулолом серця щура. 1 – контроль, 2 – рутенієвий червоний, 3 – SIN-1, 4 – SIN-1 і рутенієвий червоний, 5 – SIN-1 і L метіонін, 6 – SIN-1 і супероксиддисмутаза.

Показано, що L-метионін у концентрації 20 ммоль/л є ефективним скавенжером пероксинітриту [7]. У наших експериментах додавання до середовища інкубації L-метионіну в кінцевій концентрації 20 ммоль/л одночасно з SIN-1 призводило до ще більшого зниження швидкості транспорту кальцію CP ($0,6 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \pm 0,05 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$, $P < 0,05$; $n=6$) від контрольного рівня (рис. 2-5). Згідно з нашими результатами можна передбачати, що пероксинітрит не відіграє важливої ролі в зниженні рееструвальної швидкості транспорту кальцію у везикули CP через збільшення виходу кальцію з CP, а, мабуть, основне значення має оксид азоту і/або супероксидний радикал.

З метою розділення ефектів NO і $\cdot\text{O}_2^-$ на транспорт Ca^{2+} в CP нами використовувався скавенжер $\cdot\text{O}_2^-$ - СОД, яка вносилася в середовище інкубації в дозі 100 од. одночасно з SIN-1. Як видно з результатів, представлених на рис. 2, це істотно не змінювало характер реакції на SIN-1. Швидкість транспорту Ca^{2+} CP зменшувалась, як і в досліджах без СОД (до $1,7 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \pm 0,2 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ тканини серця, 32,6 % від початкових значень). Отримані результати свідчать, що основну роль у змінах транспорту Ca^{2+} в CP при додаванні SIN-1 відіграє оксид азоту, котрий виділяється при розпаді SIN-1. Проте достовірна різниця двох серій дослідів III і VI дає підставу вважати, що $\cdot\text{O}_2^-$ також може брати участь в дії на транспорт Ca^{2+} CP. Однак його внесок в активацію виходу Ca^{2+} з везикул CP і в зниження швидкості транспорту Ca^{2+} CP, порівняно з впливом оксиду азоту на ці процеси, відносно невеликий.

Значення досліджень з вивчення дії оксиду азоту на кальційтранспортну функцію CP істотно зросло після того, як було встановлено, що на мембранах CP локалізована NO-синтаза нейронального типу й ендогенний NO бере активну участь у модуляції активного транспорту кальцію CP [17]. Отримані нами результати узгоджуються з даними досліджень, які показали, що в мікромоль-

них концентраціях оксид азоту не впливає на активність Ca^{2+} -АТФази [16] і, разом з тим, стимулює ріанодинчутливі кальцієві канали [4, 11]. Раніше було показано [8, 6, 12], що $\cdot\text{O}_2^-$ не впливаючи на активність Ca^{2+} -АТФази, може впливати на ріанодинові рецептори CP, внаслідок чого індукується вихід Ca^{2+} з CP через канали викиду кальцію, що збігається з отриманими нами результатами.

Таким чином, аналізуючи наші результати, можна говорити про активуючу дію еквімолярних концентрацій оксиду азоту і супероксидного радикала (близько 1 мкмоль/л) на ріанодинчутливі кальцієві канали CP серця щура з переважаючим впливом оксиду азоту. Така дія оксиду азоту та супероксидного радикала може відігравати важливу регуляторну роль за фізіологічних умов. SIN-1 у поєднанні з СОД може використовуватись як ефективна модельна система для вивчення впливу оксиду азоту на функції серця.

O.Yu.Garmatina, V.I.Azarov, A.A.Moibenko

EFFECTS OF NO DONOR SIN-1 ON RATS CARDIAC SARCOPLASMIC RETICULUM CALCIUM TRANSPORT

The effects of non-enzymatic disintegration of SIN-1 products (nitric oxide, superoxide anion and peroxyxynitrite) on Ca^{2+} -transport of sarcoplasmic reticulum were studied on homogenates of rats myocardium. It was shown that SIN-1 (30 μM) exerts a significant activating effect on ryanodine-sensitive calcium channels resulted in three-fold increase of Ca^{2+} release rate via these channels. Such effect of SIN-1 realized mainly by nitric oxide effect and, partially, superoxide radical. SIN-1 did not effect the Ca^{2+} -ATPase activity of sarcoplasmic reticulum.

A.A.Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Abdelmeguid H.E., Feher J.J. Effect of low perfusate $[\text{Ca}^{2+}]$ and diltiazem on cardiac sarcoplasmic reticulum in myocardial stunning // Amer. J. Physiol. – 1994. – **266**. – P. H406-H414.

2. Belia S., Pietrangelo T., Fulle S., Menchetti G., Felaco M., Vecchiet J., Fano G. Sodium nitroprusside, a NO donor, modifies Ca^{2+} transport and mechanical properties in frog skeletal muscle // J. Muscle Res. Cell Motil. - 1998. - **19**, № 8. - P. 865-876.
3. Feher J.J., Briggs F.N., Hess M.L. Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum from ischemic myocardium: comparison of isolated sarcoplasmic reticulum with unfractionated homogenates // J. Mol. Cell. Cardiol. - 1980. - **12**, №4. - P. 427-432.
4. Hart J.D., Dulhunty A.F. Nitric oxide activates or inhibits skeletal muscle ryanodine receptors depending on its concentration, membrane potential and ligand binding // J. Membr. Biol. - 2000. - **173**, № 3. - P. 227 - 236.
5. Ishii T., Sunai ППО., Saitoh N., Nishio H., Takuchi T., Hata F. Inhibition of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by nitric oxide // FEBS Lett. - 1998. - **440**, № 1-2. - P. 218-222.
6. Kawakami M., Okabe E. Superoxide anion radical-triggered Ca^{2+} release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca^{2+} channel // Mol. Pharmacol. - 1998. - **53**, № 3. - P. 497-503.
7. Kelm M., Dahmann R., Wink D., Feelisch M. The nitric oxide / superoxide assay // J. Biolog. Chem. - 1997. - **272**, №15. - P. 9922-9932.
8. Kukreja R.C., Jesse R.L., Hess M.L. Singlet oxygen: a potential culprit in myocardial injury? // Mol. Cell. Biochem. - 1992. - **111**, №1-2. - P. 17-24.
9. Loukianov E. Analysis of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport and Ca^{2+} -ATPase enzymatic properties using mouse cardiac tissue homogenate // Anal. Biochem. - 1999. - **269**, № 2. - P. 236-244.
10. Meszaros L.G., Minarovic I., Zahradnikova A. Inhibition of the skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide // FEBS Lett. - 1996. - **380**, № 1-2. - P. 49-52.
11. Mohan P., Brutsaert D.L., Paulus W.J., Sys S.U. Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP // Circulation. - 1996 -**93**, № 6. - P. 1223-1229.
12. Okabe E. Superoxide anion radical selectively increases Ca^{2+} release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca^{2+} channel // Nippon Yakurigaku Zasshi. - 1998. - **112**, Suppl. 1. - P. 58P - 62P.
13. Pagani E.D., Solaro R.J. Methods for measuring functional properties of sarcoplasmic reticulum and myofibrils in small samples of myocardium // Meth. Pharmacol. - 1984.- **5**. - P. 49-61.
14. Rapundalo S.T., Briggs F.N., Feher J.J. Effects of ischemia on the isolation and function of canine cardiac sarcoplasmic reticulum // J. Mol. Cell. Cardiol. - 1986. - **18**, № 8. - P. 837-851.
15. Saborido A., Delgado J., Megias A. Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity and E-type Mg^{2+} -ATPase activity in rat heart homogenates // Anal. Bioch. - 1999. - **268**, № 1. - P. 79-88.
16. Stoyanovsky D., Murphy T., Anno P.R., Kim Y.M., Salama G. Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors // Cell Calcium. - 1997. - **21**, № 1. - P. 19-29.
17. Xu K.Y., Huso D.L., Dawson T.M., Bredt D.S., Becker L.C. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum // Proc. Natl. Acad. SCI USA. - 1999. -**96**, №2. - P. 657-662.
18. Zahradnikova A., Minarovic I., Venema R.C., Meszaros L.G. Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide // Cell Calcium. - 1997. - **22**, №6. - P. 447-454.

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН
України, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 4.09.2001*