

Ю.П. Коркач, О.В. Рудик, А.В. Коцюрба, О.Д. Присяжна, В.Ф. Сагач

Участь синтезу оксиду азоту та супероксид-аніона в механізмі протекторної дії екдистерону в мітохондріях серця щурів при стрептозотоциніндукованому діабеті

В работе сравнивали интенсивность генерации активных метаболитов кислорода (супероксидный анион-радикала – $\cdot O_2^-$) и азота (нитрит- и нитрат-анионы, суммарные нитрозотиолы) в митохондриях сердца крыс через 9 нед после введения им индуктора митохондриальной поры стрептозоточина (5 мг/100 г) и введения в течение 9 нед per os водного раствора экдистерона (100 нг/100 г). Как контроль использовали митохондрии сердца крыс в возрасте 6 мес. В суспензиях митохондрий сердца животных различных групп определяли такие биохимические показатели: скорость генерации $\cdot O_2^-$, содержание стабильных метаболитов оксида азота и билирубина, а также активность митохондриальных ферментов – индуцибельной и конститутивной NO-синтазы, НАДН-зависимой нитратредуктазы и индуцибельной аргиназы II. Установлено, что хроническая гипергликемия, развивающаяся после введения стрептозоточина сопровождается значительными изменениями исследованных биохимических показателей в митохондриях сердца крыс с диабетом, но не крыс, получавших экдистерон. В митохондриях сердца крыс с диабетом, не получавших экдистерон, значительно снижается активность нейрональной и содержание нитрит-аниона, суммарных нитрозотиолов и билирубина, тогда как активность iNOS, нитратредуктазы и аргиназы, а также генерация $\cdot O_2^-$, наоборот, значительно увеличиваются. Эти результаты предполагают возможное участие экдистерона не только в нормализации содержания сахара в крови, но и в предотвращении развития окислительного и нитрозативного стрессов и последующего развития митохондриальной дисфункции при таких болезнях старости, как диабет и связанных с ним гипертонической болезни, сердечной недостаточности и нейродегенеративных болезней – Альцгеймера, Паркинсона и др.

ВСТУП

Як нами було показано раніше, дисфункція кардіоміоцитів при експериментальному цукровому діабеті розвивається, незважаючи на те, що мітохондрії серця тварин з діабетом мають більш високий поріг чутливості до відкривання мітохондріальної пори іонами кальцію внаслідок їх високої здатності акумулювати іони кальцію [18]. В індукції мітохондріальної пори беруть участь активні форми кисню (АФК) та активні форми азоту (АФА). При низьких концентраціях АФК є фізіологічними моду-

ляторами транспорту Ca^{2+} у мітохондріях, що пов'язано з генерацією супероксиду та перекису водню дихальним ланцюгом мітохондрій [14].

Спричинений гіперглікемією розвиток оксидативного стресу є результатом порушення функціонування мітохондрій внаслідок дії АФК та АФА [10]. За наявності Ca^{2+} окисне пошкодження білків внутрішньої мітохондріальної мембрани викликає неспецифічну її проникність унаслідок відкривання мітохондріальної пори [14]. За умов одночасної дії оксидативного стресу, виснаження запасів АТФ і збільшення внут-

© Ю.П. Коркач, О.В. Рудик, А.В. Коцюрба, О.Д. Присяжна, В.Ф. Сагач

рішньоклітинної концентрації кальцію відбувається відкривання цієї пори, що ініціює розвиток апоптозу та некрозу клітин, порушення функції серця [11].

За хронічної гіперглікемії, зумовленої порушеннями синтезу та секреції інсуліну і, як наслідок, зниженням його вмісту у циркуляції, також спостерігається гіперпродукція як O_2^- , так і NO в мітохондріях [8]. Гіперпродукція O_2^- в аорті та серці щурів з цукровим діабетом зумовлює гіперекспресію в них індукбельної NOS і, навпаки, інгібує експресію ендотеліальної NOS [21,22]. Не виключено, що подібні процеси мають відбуватися і в мітохондріях серця.

Екдистерон – природний аналог гормональної форми вітаміну D3 – кальцитріолу – є потужним антиоксидантом, що зумовлює його здатність інгібувати як кальцій-, так і АФК-залежне відкривання мітохондріальної пори [3, 4].

Метою нашої роботи було дослідити особливості синтезу NO, продукції АФК та АФА, а також механізми протекторної дії екдистерону в мітохондріях серця щурів з хронічною гіперглікемією.

МЕТОДИКА

Показники, що характеризують окисний метаболізм кисню та азоту, визначали в ізольованих мітохондріях серця щурів-самців лінії Вістар-Кіото. Тварини поділені на три групи. До I групи (15 тварин) ввійшли інтактні щури, до II – щури (10 тварин) із модельованим діабетом, яким вводили стрептозотцин (5 мг/100 г, “Sigma”, США), до III – щури (10 тварин) з діабетом, яким із питною водою протягом 2 міс з першого дня після введення стрептозотцину давали екдистерон (100 нг/100 г). Після цього тварин II і III груп декапітували і забирали серце для виділення мітохондрій методом диференціального центрифугування в градієнті щільності сахарози [2]. Використовували водний розчин кристалічного

препарату екдистерону, виділеного із рослин *Serratula coronata* [6].

В ізольованих мітохондріях серця визначали показники, що характеризують особливості утворення як самого оксиду азоту, так і його стабільних метаболітів: активність різних ізоферментів *de novo* синтезу NO – конститутивної мітохондріальної NOS та індукбельної; інтенсивність реутилізаційного синтезу NO в мітохондріях НАДН-залежною нітратредуктазою та мітохондріальні пули АФА – нітрит- і нітрат-аніонів і сумарних нітрозотіолів. Активність NOS [19] визначали за утворенням нітрит-аніона, в інкубаційних сумішах за допомогою реактиву Гріса методом Гріна [13], вміст нітрат-аніона – за допомогою бруцинового реактиву [7]. Вміст нітрозотіолів [12] у мітохондріях визначали модифікованим реактивом Гріса, що містить іони ртуті для гідролізу нітрозотіолів. Сумарну НАДН-залежну нітратредуктазну активність визначали за зменшенням вмісту нітрат-аніона за наявності надлишку НАДН (“Sigma”, США) [1].

Інтенсивність окисного метаболізму в мітохондріях серця щурів з експериментальним цукровим діабетом I типу та протекторну дію екдистерону оцінювали за швидкістю генерації нестабільного вільного радикала кисню – супероксидного аніон-радикала (O_2^-), оцінюючи пули сечової кислоти (маркер активності генератора O_2^- ксантиноксидази), пули дієнових кон’югатів (маркери інтенсивності перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у мітохондріях) та мітохондріальні пули білірубину, який утворюється за дії гемоксидази одночасно із оксидом вуглецю та двовалентним залізом, що є каталізатором утворення OH^- . Швидкість генерації O_2^- визначали за окисненням цитохрому С в 10 моль/л трис-буфері рН 7,4, фіксуючи зміни екстинції при 550 нм після інкубації сумішей при 37°C протягом 30 хв. Вміст O_2^- , генерованого пробами під час інкубації, визначали

використовуючи коефіцієнт молярної екстинції $\epsilon = 21000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [16]. Вміст сечової кислоти, білірубину та сечовини (для дослідження індуцибельної мітохондріальної аргінази II), визначали за допомогою добірки відповідних реактивів (“Сечова кислота”, “Сечовина”, “Білірубін”, фірми «Філіст-Діагностика», Україна). Вміст дієнових кон’югатів (ДК) визначали за поглинанням при 232 нм спектрофотометрично в гептанових екстрактах проб. Вміст загального мітохондріального білка вивчали використовуючи барвник Cumassi G-250 (“FERAK” Німеччина).

Результати обробляли методом варіаційної статистики використовуючи програмне забезпечення Origin 6.0 (“Microcal Software, Inc”, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За хронічної гіперглікемії в мітохондріях відбувався значний перерозподіл активності синтезу оксиду азоту різними ізоферментами NOS на користь індуцибельної, активність якої збільшувалася втричі, при

цьому конститутивний синтез NO мітохондріальним ізоферментом нейрональної NOS, навпаки, знизився майже в 6 разів. Значно (більш ніж у 3 рази) підвищувалася також активність сумарної НАДН-залежної нітратредуктази, яка активується лише при зниженні доступності кисню для *de novo* синтезу NO (таблиця). Відомо, що основними продуцентами реутилізаційного NO ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$) в мітохондріях є цитохром С-оксидаза та ксантинооксидаза [17].

У наших дослідженнях при цукровому діабеті в мітохондріях серця підвищувалася активність ксантинооксидази, про що свідчило збільшення майже втричі вмісту сечової кислоти. Використання екдистерону інгібувало цю активність і тим самим зменшувало як пули сечової кислоти, так і генерацію O_2^- ксантинооксидазою.

Таким чином, не виключено, що при цукровому діабеті в мітохондріях серця виникає дефіцит кисню, який зумовлює значне посилення реутилізаційної генерації NO і, навпаки, пригнічення конститутивного його синтезу. Ці зміни синтезу NO не

Дія екдистерону на зміни біохімічних показників у мітохондріях серця щурів з експериментальним стрептозотоциніндукованим діабетом (M ± m)

Показник	Контроль (I група; n = 15)	Діабет (II група; n = 10)	Діабет і введення екдистерону (III група; n = 10)
NO-синтаза, $\mu\text{mоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$			
індуцибельна	1,73 ± 0,24	5,29 ± 0,26*	2,01 ± 0,28**
нейрональна	3,64 ± 0,27	0,65 ± 0,01*	6,48 ± 0,40***
Нітратредуктаза $\mu\text{моль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$	0,86 ± 0,05	3,16 ± 0,45*	1,47 ± 0,13***
Аргіназа II $\mu\text{моль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$	0,21 ± 0,02	3,10 ± 0,36*	1,02 ± 0,13***
NO_2^- , $\mu\text{моль} \cdot \text{мг}^{-1}$	126,03 ± 17,20	23,81 ± 3,15*	94,52 ± 6,30**
NO_3^- , $\mu\text{моль} \cdot \text{мг}^{-1}$	76,3 ± 4,1	158,7 ± 13,0*	95,4 ± 9,9**
Нітрозотіоли, $\mu\text{моль} \cdot \text{мг}^{-1}$	411,40 ± 38,51	255,16 ± 37,04*	510,11 ± 41,15**
O_2^- , $\mu\text{моль} \cdot 30 \text{ хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$	47,13 ± 7,52	159,35 ± 22,57*	56,94 ± 6,58**
Сечова кислота, $\mu\text{моль} \cdot \text{мг}^{-1}$	3,49 ± 0,26	9,36 ± 1,40*	2,34 ± 0,31**
Дієнові кон’югати, $\text{нг} \cdot \text{мг}^{-1}$	3,60 ± 0,25	14,54 ± 1,80*	2,95 ± 0,50**
Білірубін, $\mu\text{моль} \cdot \text{мг}^{-1}$	8,90 ± 1,12	3,89 ± 0,62*	4,42 ± 0,31*

* P < 0,05 відносно контролю; **P < 0,05 щодо значень у тварин з цукровим діабетом.

відбувалися при постійному введенні екдистерону, починаючи з першої доби після введення стрептозотоцину. При введенні цього гормону - можливого регулятора синтезу CaSR, кальційзв'язувального білка calbindin D28K, кальційселективного каналу TRPV6 та активатора багатьох сигнальних каскадів, у т.ч. сфінгомієлінового, нормалізувалась активність індукцибельної NOS, частково нітратредуктази, а активність конститутивного синтезу NO посилалась навіть до значень вищих за контрольні.

Результати наших досліджень свідчать про те, що пули стабільних метаболітів NO в мітохондріях серця шурів – нітрит-аніона і сумарних нітрозотіолів при цукровому діабеті суттєво зменшились і нормалізувались за допомогою екдистерону, тоді як пули нітрат-аніона, навпаки, підвищувались і також сягали фізіологічної норми. Позаяк нітрозотіоли є крім усього іншого ще і депо NO, то зниження їх вмісту при цукровому діабеті може свідчити про можливість активації їх декомпозиції (звільнення NO) і збільшення вмісту декомпозиційних пулів NO, функції якого в мітохондріях ще нез'ясовані.

Як відомо, пули нітриту утворюються лише спонтанно в окисгенованих водних розчинах або ферментативно за дії нітратредуктази, тоді як пули нітрат-аніона – спонтанно при розпаді пероксинітриту чи ферментативно при окисненні NO гемовмісними білками [5].

Збільшення майже втричі швидкості генерації супероксид-аніона (O_2^-) в мітохондріях серця шурів з цукровим діабетом з урахуванням даних літератури про зниження окисного фосфорилування в мітохондріях за умови хронічної гіперглікемії [15] може свідчити про зниження активності мітохондріальної СОД (Mn – СОД) відповідальної за утворення пероксиду водню. Активність СОД у мітохондріях регулюється ступенем її фосфорилування, яке

контролюється рівнями експресованого CaSR. Підвищення активності таких генераторів O_2^- , як ксантиноксидаза, ліпідні оксидази чи мітохондріальної NOS також може бути причиною підвищеної генерації супероксид-аніона в мітохондріях за цукрового діабету. Нейрональна NOS за умов нестачі субстрату – L-аргініну при високій активності мітохондріальної аргінази може генерувати O_2^- . Нещодавно встановлено, що ендотеліальна NOS за умов гіпоксії як субстрат для синтезу NO використовує не L-аргінін, а нітрит-аніон, тобто функціонує як нітритредуктаза [23]. Є всі підстави вважати, що цей процес може відбуватися в мітохондріях серця шурів з діабетом і спричиняти значне зниження активності нейрональної NOS у мітохондріях.

Високі рівні генерації O_2^- одночасно з підвищенням активності індукцибельної і нітратредуктазної генерації NO в мітохондріях серця шурів з діабетом створюють умови для утворення пероксинітриту ($NO + O_2^- = ONOO^-$), який, як відомо, є інгібітором транспорту електронів у мітохондріях і розвитку мітохондріальної дисфункції за діабету [8].

Проведеними дослідженнями було встановлено, що екдистерон здатний повністю нормалізувати рівні генерації O_2^- в мітохондріях серця шурів, можливо, внаслідок підвищення активності Mn-СОД чи, навпаки, зниження активностей генераторів супероксиду. В зв'язку з тим, що молекула екдистерону містить велику кількість гідроксильних груп, він є потужним антиоксидантом і пасткою для вільних радикалів.

Як відомо, при підвищенні концентрації протонів пероксинітрит може розпадатися також з утворенням двох вільних радикалів – діоксиду азоту ($\cdot NO_2$) і гідроксил-радикала ($\cdot OH$). Згідно з нашими результатами цей процес у мітохондріях серця шурів з діабетом I типу значно посилювався, про що свідчила наявність високого вмісту ДК, який нормалізувався за дії екдистерону, що

є проявом його потужної антирадикальної та антиокисної дії.

Захисна дія екдистерону реалізується також через вплив на чинники, що, можливо, зумовлюють зміни синтезу NO в мітохондріях серця щурів. Серед них можуть бути аргіназа, яка конкурує з NOS за спільний субстрат L-аргінін, супероксид, який підсилює експресію індукцибельної NOS та інгібує експресію нейрональної NOS, білірубін, який є маркером утворення оксиду вуглецю гемоксигеназою та конкурує з NO за його місце зв'язування в мітохондріях.

Можливо, що екдистерон нормалізує синтез NO в мітохондріях внаслідок інгібування активності мітохондріальної аргінази II, підвищеної у дослідних тварин з діабетом більше ніж у 10 разів. Отримані нами результати збігаються з даними інших авторів [9], про те, що аргіназний неокисний метаболізм L-аргінину може конкурувати із конститутивним окисним *de novo* синтезом NO мітохондріальним ізоферментом NOS.

Крім того, нами було виявлено, що в мітохондріях серця щурів з цукровим діабетом більш ніж удвічі знизився вміст білірубину, що є продуктом ферментативної або неферментативної деградації гем. Ферментативно гемоксигеназа, що має дві ізоформи – конститутивну ГО-2 та індукцибельну ГО-1 може руйнувати гем. Згідно з даними літератури, функції їх різні, а саме токсичну дію чинять продукти ГО-1 (білірубін, Fe^{2+} та CO), тоді як протекторна дія цих самих продуктів може проявлятися при утворенні ГО-2 [20].

Слід зазначити, що продукти діяльності саме ГО-2 здатні спричинити підвищення активності різних ізоферментів СОД, що в свою чергу, забезпечує зниження внутрішньомітохондріальних пулів O_2^- і, як наслідок, мітохондріальних пулів пероксинітриту, що є важливою передумовою для відновлення транспорту електронів у мітохондріях. Екдистерон не змінював сумарні пули

(за дії ГО-1 і ГО-2) білірубину в мітохондріях серця щурів, але не виключено, що його дія проявлялась у збільшенні частки протекторного білірубину, синтезованого ГО-2.

На підставі аналізу результатів наших досліджень можна стверджувати, що одними з основних причин зростання неконститутивного (внаслідок активації індукцибельного і реутилізаційного) мітохондріального синтезу NO та генерації O_2^- в мітохондріях серця щурів з діабетом I типу може бути:

- значне підвищення активності мітохондріальної аргінази II, яка конкурує за спільний субстрат L-аргінін з мітохондріальною NOS;

- підвищення генерації O_2^- в мітохондріях, який підсилює експресію індукцибельної NOS і, відповідно, синтез індукцибельного NO, інгібує експресію нейрональної NOS і синтез конститутивного NO;

- зниження активності гемоксигенази в мітохондріях, про що свідчить зниження мітохондріальних пулів білірубину, яке може призводити до активації індукцибельної NOS і інгібування активності нейрональної NOS.

ВИСНОВКИ

1. За тривалої гіперглікемії, викликаній введенням індуктора мітохондріальної пори стрептозотоцину, відбуваються значні зміни синтезу оксиду азоту в мітохондріях серця щурів. Тривала гіперглікемія викликає значне підвищення активності індукцибельної NOS і, відповідно, синтезу індукцибельного NO в мітохондріях серця і, навпаки, зниження активності конститутивної мітохондріальної NOS або нейрональної NOS, і синтезу конститутивного NO.

2. Тривала гіперглікемія спричинює виникнення гіпоксичного стану в мітохондріях, про що свідчить підвищення активності мітохондріальної нітратредуктази та перетворення молекулярного кисню в O_2^- .

3. Підвищення частки індукцйбельного і реутилізаційного NO в мітохондріях серця щурів за тривалої гіперглікемії супроводжується підвищенням пулів нітрат-аніона, можливо, внаслідок розпаду пероксинітриду, при цьому мітохондріальні пули як нітрит-аніона, так і нітрозотіолів, навпаки, знижуються, що вказує на інтенсифікацію синтезу не лише індукцйбельного NO, але і можливість синтезу NO в мітохондріях за діабету також внаслідок декомпозиції (вивільнення NO) нітрозотіолів.

4. При введенні C_{27} -стероїдного гормону екдистерону стрептозоточин не викликав зниження конститутивного *de novo* синтезу NO в мітохондріях серця щурів і підвищення його синтезу внаслідок реутилізації нітрат- і нітрит-аніонів, підвищення кальційнезалежної активності індукцйбельної NOS і декомпозиції нітрозотіолів. Цей ефект екдистерону зумовлюється його інгібувальною дією на активність індукцйбельної NOS, нітратредуктази і аргінази II в мітохондріях серця, а також зниженням генерації O_2^- .

Ju.P. Korkach, O.V. Rudyk, A.V. Kotsuruba, O.D. Prisyazhna, V.F. Sagach

THE NITRIC OXIDE AND SUPEROXIDE SYNTHESIS IN PROTECTIVE ACTION OF ECDYSTERONE IN MITOCHONDRIAS OF RAT'S HEARTS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

This study evaluated generation of O_2^- and NO in heart mitochondria isolated from 9-week old streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats and the effect of ecdysterone treatment on these parameters. Mitochondria isolated from 9-week old placebo-treated rats were used as control. Several parameters were evaluated: O_2^- production, the levels of stable NO metabolites nitrate, nitrite and total nitrosothiols, the level of bilirubine (as marker of CO generation), inducible (iNOS) and constitutive (nNOS) mtNOS, NADH-dependent nitrate reductase (NR) and inducible arginase II (AII) activity. We observed that diabetes was accompanied by a significant decrease in nNOS activity, nitrite, total nitrosothiols and bilirubine content while iNOS, NR and AII activity, as well as O_2^- generation was increased in heart mitochondria. Ecdysterone treatment normalized the levels of stable NO metabolites, ability to generate superoxide, iNOS and nNOS activity, but not bilirubine

level, NR and AII activity. These results suggest that ecdysterone treatment attenuates diabetes-induced mitochondrial alterations protecting against oxidative and nitrosative stresses. Thus, ecdysterone therapy, besides its well known importance in the maintenance of glycemic control, may help to protect against mitochondrial dysfunction associated to several age-related disorders.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

O.V. Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аликулов З.А., Львов Н.П. Кретович В.Л. Нитрат- и нитрит- редуказная активности молока // Биохимия. – 1980. – **45**, №9. – С. 1714–1718.
2. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия // Там же. – 1985. – **50**, №8. – С.1350–1361.
3. Коцюруба А.В., Коркач Ю.П., Рудик Е.В. и др. Эффективность экдистерона как ингибитора МРТ в митохондриях сердца старых крыс; кардиопротекция путем коррекции окислительного (*de novo*) и восстановительного (*salvage*) путей синтеза NO в митохондриях: Материалы международ. симпози. «Активные формы кислорода, азота и хлора в регуляции клеточных функций в норме и патологии» (28–29 сент. 2006 г., Гродно). – Ч.1. – С.157–162.
4. Кузьменко А.И., Морозова Р.П., Николенко И.А., Донченко Г.В. Изучение антиокислительного эффекта 20-гидроксиэкдизона в модельной системе // Укр.биохим.журн. – 1999. – **71**, №3. – С. 35–38.
5. Синяченко О.В., Звягина Т.В. Оксид азота в терапевтической практике. – Донецк, 2001. – 256 с.
6. Холодова Ю.Д. Фитоэкдистероиды// Биохимия животных и человека. – 1987. – №11. – С.27–41.
7. Шугалей В.С., Козина А.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду // Физиол. журн. СССР. –1977. – № 8. – С.1199–1202.
8. Brodsky S.V., Gao S., Li H., Goligorsky M.S. Hyperglycemic switch from mitochondrial nitric oxide to superoxide production in endothelial cells // Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol. – 2002. – **283**, № 5. – P. 2130–2109.
9. Chicoine L.G., Paffet M.L., Young T.L., Nelin L.D. Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells //Amer. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. – 2004. – **287**, №1. – P. 60–68.
10. Costantini P., Belzacq A.S., Vieira H.L. et al. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis // Oncogene. –

2000. – **19**, №2. – P.307–317.
11. Crompton M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2000. – **12**, №4. – P.414–419.
 12. Gerdel D., Cederbaum A.J. Inhibition of the catalytic activity of alkoholdehydrogenase by NO is associated with S-nitrosylation and the release of zinc // *Biochemistry.* – 1996. – **35**, № 50. – P.16186–16194.
 13. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.* – 1982. – **126**, № 1. – P.131–138.
 14. Gunter T.E., Yule D.I., Gunter K.K. et al. Calcium and mitochondria // *FEBS Cell.* – 2004. – **567**, №1. – P. 96–102.
 15. Huang Q., Shao L., Jiang H. et. al. Effect of insulin on oxygen free radicals and oxidative phosphorylation in liver mitochondria of diabetic rats // *Acta Pharm. Sin.* – 2001. – **22**, №5. – P. 455–458.
 16. Kuthan H., Ullrich U., Estabrook R.W. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems // *Biochem. J.* – 1982. – **203**, №3. – P. 551–558.
 17. Loke K.E., Laycock S.K. Mital S. et. al. Nitric oxide modulates mitochondrial respiration in failing human heart // *Circulation.* – 1999. – **100**, № 12. – P.1291–1297.
 18. Sagach V.F., Vavilova G.L. Rudyk O.V., Strutyns'ka N.A. The Sensitivity of the nitichondrial permesibility transition pore opening in diabetic rat heart // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **72**, №2. – С. 73.
 19. Salter M., Knowles R.G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide syntases // *FEBS Lett.* – 1991. – **291**, № 1. – P. 145–149.
 20. Schipper H.M. Heme oxygenase-1: transducer of pathological brain iron sequestration under oxidative stress // *Ann N Y Acad Sci.* – 2004. – **1012**. – P.84–93.
 21. Srinivasan S, Hatley M.E., Bolick D.T. et. al. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells // *Diabetologia.* – 2004. – **47**, №10. – P.1727–1734.
 22. Xu W.M., Liu L.Z., Charles I.S. Microencapsulated iNOS-expressing cells cause tumor suppression in mice // *FASEB J.* – 2001. – **15**. – P.131–148.
 23. Zhang Z., Naughton D., Winyard P.G. Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1998. – **249**, №3. – P. 767–772.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 05.07.2007*