

О.В. Аكوпова, А.В. Коцюрба, О.М. Харламова, Ю.П. Коркач, В.Ф. Сагач

## Роль мітохондрій у NO-залежній регуляції активності $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФази аорти щурів

За умов *in vivo* досліджено взаємодію двох іонотранспортних механізмів серцево-судинної системи ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази аорти щурів та  $\text{Ca}^{2+}$ -акумуляційної системи мітохондрій) у короткотерміновій відповіді на дію донора NO нітрогліцерину (НГ). Активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази визначали в аорті, тоді як акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  – в ізольованих мітохондріях міокарда щурів, виходячи з припущення, що метаболічні перетворення в мітохондріях міокарда під дією NO подібні до тих, що відбуваються в мітохондріях тканин аорти. Одержані результати показують дозозалежну скоординовану дію NO на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази та накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях. Встановлено, що активація  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази низькими дозами НГ (0,25 мг/кг) супроводжується збільшенням накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях внаслідок інгібування мітохондріальної пори. Проте подальше збільшення дози НГ призводить до реципрокних змін досліджених показників – зниження активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази відносно контролю та навпаки – підвищення накопичення  $\text{Ca}^{2+}$ , яке сягає максимальних значень при введенні 1,0 мг/кг НГ. Паралельно у мітохондріях спостерігається різке збільшення генерації активних форм азоту та кисню (АФА й АФК), продуктів їх токсичної дії – нітрозотіолів і вільного заліза ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Установлено певну кореляцію між накопиченням  $\text{Ca}^{2+}$ , вивільненням заліза з мітохондрій і перерозподілом АФК в аорті на користь утворення  $\cdot\text{OH}$ -радикала при відповідному зменшенні пулів  $\text{H}_2\text{O}_2$  та  $\cdot\text{O}_2^-$  в аорті і нітрозотіолів в ізольованих мітохондріях. Таким чином, висунуто гіпотезу, що особливістю метаболізму АФК і АФА в аорті є перерозподіл їх утворення на користь  $\cdot\text{OH}$ -радикала, з пулів  $\text{H}_2\text{O}_2$  та  $\cdot\text{O}_2^-$  внаслідок активації реакції Хабер-Вайсса, каталізованих вивільненими з мітохондрій іонами заліза, а також внаслідок вільнорадикального розпаду пероксинітриду, джерелом якого є мітохондріальний пул нітрозотіолів. Отже, результати експерименту вказують на важливу роль мітохондрій в індукованій іонами заліза активації вільнорадикальних перетворень АФК і АФА, що призводить до посилення оксидативного стресу та інгібування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази. Відновлення активності ферменту потужним антиоксидантом мелатоніном, підтверджує оксидативну природу інгібування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази в аорті щурів.

Ключові слова:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза, мітохондрії,  $\text{Ca}^{2+}$ , активні форми кисню, активні форми азоту, аорта, міокард, оксидативний стрес.

### ВСТУП

Зміни вмісту NO та його метаболітів, так званих активних форм азоту (АФА), забезпечують контроль судинного тонуусу у серцево-судинній системі. Відомо, що вазодилататорна дія NO опосередковується сукупною роботою різних іонотранспортних систем клітини: каналів, обмінників, транспортних ферментів. Важливу роль у контролі судинного тонуусу,

як відомо, відіграє  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза (натрієвий насос), фермент, що забезпечує електрогенний трансмембранний обмін  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  проти градієнта концентрацій катіонів внаслідок гідролізу АТФ [4]. Підтримання високого мембранного потенціалу перешкоджає надходженню  $\text{Ca}^{2+}$  з позаклітинного середовища як через потенціалкерівані кальцієві канали, так і через  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник, робота якого також залежить від мембранного потенціалу – ( $\Delta\Psi_m$ ) [11].

© О.В. Аكوпова, А.В. Коцюрба, О.М. Харламова, Ю.П. Коркач, В.Ф. Сагач

Останнім часом багато уваги у механізмах регуляції внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  приділяють мітохондріям, їх кальцій-транспортній системі, завдяки якій ці органели здатні акумулювати велику кількість кальцію у відповідь на дію фізіологічно активних агентів [7]. Тим важливішим є вивчення взаємодії іонотранспортних систем мітохондрій і плазматичної мембрани у регуляції кальцієвого гомеостазу клітин у фізіологічних умовах. Але ні  $\text{Ca}^{2+}$ -акумулювальна система мітохондрій, ні  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза у тканинах серцево-судинної системи не привертала достатньо уваги як потенційна мішень дії NO – універсального регулятора багатьох фізіологічних функцій.

Відомо, що у клітині «скупчення» мітохондрій розташоване безпосередньо поблизу плазматичної мембрани, а також саркоплазматичного ретикулума (СР) та клітинного ядра [8, 15, 23]. Така внутрішньоклітинна локалізація є передумовою тісного функціонального взаємозв'язку мітохондрій з плазматичною мембраною клітин, СР і клітинним ядром [15], що може проявлятися у передачі клітинних сигналів різного походження. Нещодавні дослідження вказують на існування спільних контактних сайтів, що передають кальцієві сигнали між мітохондріями та СР [23].

Оскільки більшість внутрішньоклітинно утворених АФК і АФА також є сигнальними молекулами [19], значний інтерес становлять дослідження їх участі у взаємодії мітохондрій з плазматичною мембраною клітин, зокрема виявлення можливої ролі мітохондрій у регуляції активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази, що за нашими попередніми даними може проявлятися у відповідь на дію екзогенного NO. Широко застосовуваний у клініці нітрогліцерин (гліцеролтринітрат) в організмі стає донором NO внаслідок біотрансформації, механізм якої достеменно невідомий. Припускають, що у перетворенні нітрогліцерину бере участь

певна сукупність ферментів, серед яких система цитохрому Р-450, глутатіон-S-трансфераза [18], а також мітохондріальна ізоформа альдегіддегідрогенази ALDH-2 [14]. Відомо також, що перетворення нітрогліцерину полегшується за наявності тіолів як відновних агентів [18].

Нещодавно нами було висловлено припущення, що інгібування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази аорти щурів зумовлене активацією метаболізму АФК і АФА під впливом екзогенного NO [2]. Раніше встановили, що мітохондрії відіграють значну роль у перетвореннях АФК і АФА під дією донора NO [1]. Отже, метою цієї роботи було подальше висвітлення ролі мітохондрій у регуляції метаболізму АФК і АФА, а також з'ясування можливого впливу мітохондрій на регуляцію активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази за допомогою окисного метаболізму АФК і АФА у відповідь на дію різних доз фармакологічного донору NO нітрогліцерину. Досліджуючи роль метаболізму АФК і АФА у взаємодії мітохондрій з плазматичною мембраною клітин аорти, ми виходили з припущення, що метаболічні перетворення в мітохондріях міокарда, які активуються під дією NO, подібні до тих, що відбуваються і в мітохондріях тканин аорти. Тому у дослідах нами були використані ізольовані мітохондрії міокарда щурів.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на білих щурах лінії Вістар масою 200–250 г. Нітрогліцерин вводили внутрішньоочеревинно у дозах 0,25, 0,5, 1,0 і 1,5 мг/кг. Контрольним щурам вводили фізіологічний розчин. Аорти і серця, видалені через 5 хв після введення нітрогліцерину, ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl (2°C), подрібнювали та гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища: 250 ммоль/л сахарози, 20 ммоль/л тріс-НСІ-буфера, 1 ммоль/л ЕДТА; рН 7,4.

Для виділення мітохондрій гомогенат центрифугували 7 хв при 700 g ( $4^\circ\text{C}$ ), після чого супернатант центрифугували 15 хв при 11000 g ( $4^\circ\text{C}$ ). Осад суспендували у невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА та зберігали при  $4^\circ\text{C}$ . Вміст білка знаходили за методом Лоурі.

Активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази визначали у гомогенаті аорти при  $37^\circ\text{C}$  у середовищі такого складу (ммоль/л): тріс- $\text{HCl}$ -буфер – 25,  $\text{MgCl}_2$  – 5,  $\text{NaCl}$  – 100,  $\text{KCl}$  – 10,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  – 3, рН 7,4 у об'ємі 1 мл за приростом неорганічного фосфору ( $\text{P}_i$ ) методом Фіске–Суббароу як різницю між загальною  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазною активністю та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазною активністю за наявності  $10^{-3}$  моль/л убаїну та виражали у мікромолях  $\text{P}_i$  на 1 мг білка за 1 год.

Транспорт кальцію реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 654 нм за наявності 70 мкмоль/л арсеназо-III. Для цього мітохондрії поміщали у середовище такого складу (ммоль/л):  $\text{KCl}$  – 120,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  – 1,  $\text{MgCl}_2$  – 1,  $\text{CaCl}_2$  – 0,1, тріс- $\text{HCl}$ -буфер – 20 (рН 7,4). Кальцієву ємність визначали як максимальну кількість кальцію, акумульовану у мітохондріях, і виражали у наномолях  $\text{Ca}^{2+}$  на 1 мг білка.

Концентрацію стабільних метаболітів NO, нітриту ( $\text{NO}_2^-$ ) та нітрозотіолів визначали спектрофотометричним методом Гріна [16]. Вміст високомолекулярних нітрозотіолів (нітрозильованих білків, ВМНТ) знаходили як різницю між загальним вмістом нітрозотіолів і вмістом низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ), як описано нами раніше [1]. Основну частку НМНТ становить нітрозоглутатіон. Вміст нітрату ( $\text{NO}_3^-$ ) визначали бруциновим методом [6], пероксиду водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) – спектрофотометрично у  $\text{KJ}$ /лактопероксидазній системі у 0,05 моль/л фосфатному буфері (рН 7,33) при довжині хвилі 353 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання  $26000 \text{ моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$  [17].

Утворення гідроксильного радикала

( $\cdot\text{OH}$ ) оцінювали за методом Conte та співавт. [13] в інкубаційній суміші: 20 ммоль/л 2-деокси-D-рибози, 1 ммоль/л  $\text{H}_2\text{O}_2$  у 20 ммоль/л  $\text{Na}$ -фосфатному буфері (рН 7,4); генерацію  $\cdot\text{OH}$ -радикала оцінювали за утворенням малонового діальдегіду, який визначали за зміною поглинання при довжині хвилі 532 нм і виражали в одиницях поглинання OD за 1 год на 1 мг білка.

Швидкість генерації супероксид-аніона ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) визначали в інкубаційній суміші за окисненням цитохрому с (рН 7,4) за зміною поглинання при довжині хвилі 550 нм після 30-хвилинної інкубації, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання  $21000 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [10].

Вміст вільного заліза ( $\text{Fe}^{2+}$ ) визначали за стандартною методикою, застосовуючи реактиви фірми «Філісит Діагностика» (Україна).

У роботі використано такі реагенти: додецилсульфат  $\text{Na}$ , тріс (основа), (“Serva”; ФРН),  $\text{Na}_2\text{ATP}$  (“Reanal”; Угорщина), убаїн, сульфаніламід, N-нафтилендіамін-гідрохлорид, бруцин, цитохром с, 2-деокси-D-рибоза, лактопероксидаза (“Sigma”, США), арсеназо-III, рутенієвий червоний, циклоспорин А (“Fluka”; ФРН) та реактиви вітчизняного виробництва марки ч.д.а. Розчини готували на бідистильованій воді. Достовірність оцінювали за критерієм t Стьюдента. Значення  $P < 0,05$  вважали статистично значимим.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 наведено результати вивчення впливу нітрогліцерину на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази аорти та акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях серця щурів. Показано дозозалежну модульовальну дію NO на досліджувані іонотранспортні механізми серцево-судинної системи. Так,  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях накопичується у межах  $\leq 1 \text{ мг/кг}$  нітрогліцерину від ( $38,2 \pm 6,2$ ) до ( $110,0 \pm 8,0$ )

нмоль  $\text{Ca}^{2+}$ /мг білка, і лише за дії великих доз нітрогліцерину спостерігається 50 %-ве зниження кальцієвої ємності мітохондрій. Активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази, навпаки, спочатку стрімко, на 87,5 %, зростає за дії низьких доз нітрогліцерину (0,25 мг/кг) від  $(7,6 \pm 0,5)$  у контролі до  $(14,3 \pm 0,5)$  мкмоль  $\text{P}_i \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  ( $P < 0,01$ ) із подальшим поступовим дозозалежним зниженням відносно контролю до -56,7 % при 1,0 мг/кг нітрогліцерину. Отже, дія низьких його доз з одного боку призводить до посилення акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях і, відповідно, до видалення іонів кальцію із цитозолу у мітохондріальний матрикс, а з іншого – до активації електрогенного  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -антипорту,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази, функціональна активність якої, як уже зазначалося, спрямована на підтримання високого мембранного потенціалу клітин, що перешкоджає надходженню  $\text{Ca}^{2+}$  з позаклітинного простору через потенціалкервані кальцієві канали та  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник сарколеми [11]. Таким чином, одержані результати свідчать, що як активація  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази, так і посилена акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях, які спрямовані на зниження цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , є складовими у вазодилаторних реакціях, зумовлених введенням низьких доз нітрогліцерину.

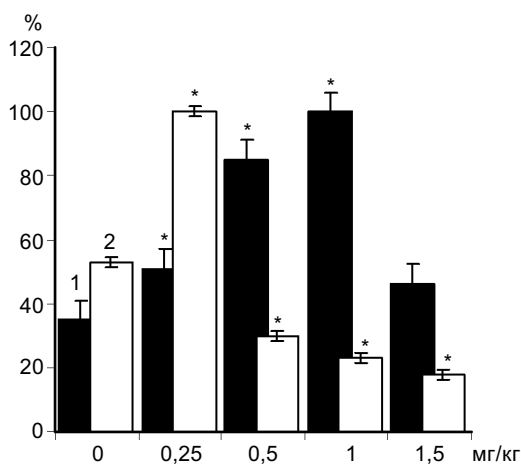


Рис. 1. Вплив різних доз нітрогліцерину (мг/кг) *in vivo* на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази (1) та акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях (2) у відсотках відносно максимальних значень

Раніше нами було показано [3], що накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях, кальцієва ємність за інших рівних умов визначається балансом між акумуляцією  $\text{Ca}^{2+}$  через кальцієвий уніпортер та вивільненням іонів кальцію через циклоспоринчутливу мітохондріальну пору. Тому для з'ясування впливу NO *in vivo* на здатність мітохондрій до відкриття пори нами було досліджено нечутливе до рутенієвого червоного (блокатора уніпортера) та чутливе до циклоспорину А, інгібітора пори, вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій після накопичення у мітохондріях однакової його кількості: 30 нмоль/мг білка. Одержані результати (рис. 2) показують, що введення донора NO *in vivo* у дозі 1 мг/кг, яка максимально стимулює накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях і одночасно максимально інгібує активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази, призводить до пригнічення циклоспоринчутливого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій. Таким чином, оксид азоту ефективно пригнічує відкриття мітохондріальної пори не тільки *in vitro*, як було показано нами раніше [1], але й *in vivo*, при збільшенні вмісту АФА у серцево-судинній системі вище від базального.

Для подальшого з'ясування впливу NO на метаболізм АФК і АФА у серцево-

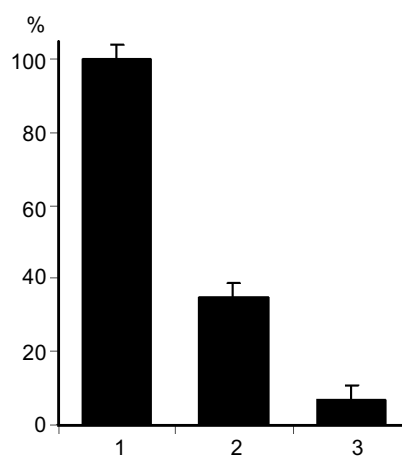


Рис. 2. Вплив нітрогліцерину (мг/кг) на циклоспоринчутливе вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  (%) з мітохондрій міокарда щурів після його акумуляції: 1 – контроль; 2 – введення нітрогліцерину; 3 – контроль за наявності циклоспорину А

судинній системі та висвітлення механізмів короткотермінової відповіді іонотранспортних систем мітохондрій і плазматичної мембрани на дію нітрогліцерину, нами було досліджено вплив різних доз цього фармакологічного донора NO на деякі показники оксидативного та нітрозативного стресу, а саме, на вміст АФК і АФА, відповідно, в аорті та ізольованих мітохондріях міокарда щурів. Висновки про вміст АФА робили на основі визначення вмісту його стабільних метаболітів: нітрит- та нітрат-аніонів ( $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ ), НМНТ, а також ВМНТ, які є формою депонування і джерелом NO у його метаболічних перетвореннях [5].

Результати визначення вмісту АФК і АФА (рис. 3, 4) вказують на певні відмінності їх метаболізму в аорті та в ізольованих мітохондріях серця щурів внаслідок дії нітрогліцерину. Так, хоча загальний вміст АФА як в аорті, так і в ізольованих мітохондріях зростає за його дії від  $1,63 \pm 0,04$  до  $2,4$  нмоль/мг  $\pm 0,07$  нмоль/мг та  $0,71 \pm 0,03$  до  $2,9$  нмоль/мг  $\pm 0,05$  нмоль/мг відповідно оцінка змін відносного вмісту АФА за дії кожної із доз нітрогліцерину (див. рис. 3) показує, що в мітохондріях спостерігається перерозподіл АФА на користь більш окис-

нених їх форм, головним чином нітрату, кінцевого продукту перетворень NO (при зовсім незначному вмісті нітрит-аніона). Також у мітохондріях значно зменшується пул НМНТ, порівняно із цілою тканиною, що спостерігали і раніше [1]. Результати також свідчать, що в ізольованих мітохондріях (див. рис. 3,б) відбувається майже 50%-ве вичерпання пулу ВМНТ на користь утворення  $\text{NO}_3^-$ . В аорті, навпаки, спостерігається окиснення NO лише до нітриту, при зовсім незначному вмісті нітрат-аніона, а також набагато більший відносний вміст НМНТ порівняно з їх пулом у мітохондріях. Також в аорті, на відміну від мітохондрій, спостерігається загальний приріст вмісту нітрозильованих білків (див. рис. 3,а).

Очевидно, що зміни вмісту АФА в аорті є безпосереднім наслідком введення донора NO, нітрогліцерину та його ферментативних перетворень [14, 18]. Втім однією з вірогідних причин, що визначають відносні зміни вмісту АФА у мітохондріях і в аорті, на нашу думку, також є метаболізм АФК і активація вільно-радикальних та окисно-відновних реакцій за участю високо-реактивних метаболітів кисню. Так, внаслідок збільшення надходження  $\text{Ca}^{2+}$  до

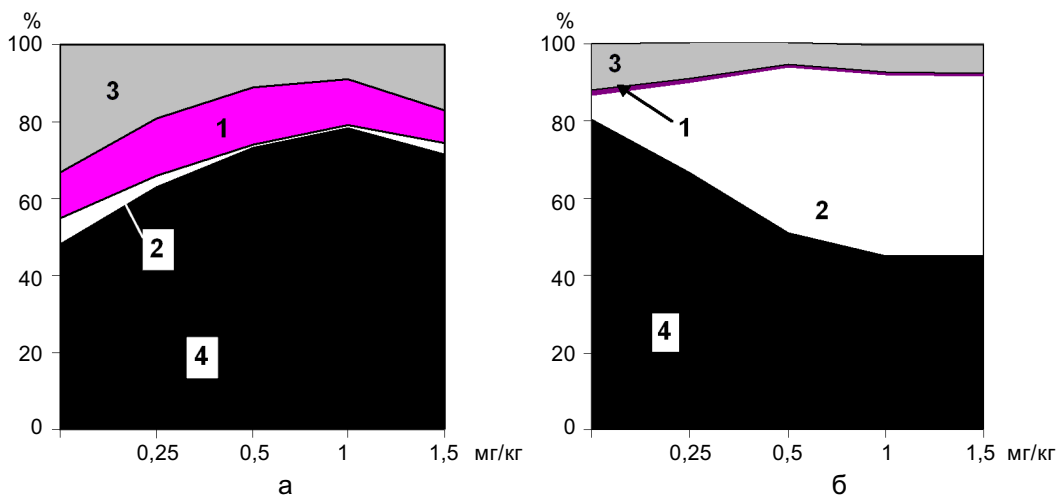


Рис. 3. Вплив різних доз нітрогліцерину *in vivo* на зміну відносного вмісту активних форм азоту (АФА) в аорті (а) та мітохондріях серця (б) щурів. За 100 % приймали загальний вміст АФА за дії кожної дози нітрогліцерину; відносний вміст окремих АФА виражали у відсотках від його загального вмісту: 1 – нітрит, 2 – нітрат, 3 – низькомолекулярні нітрозотіоли, 4 – високомолекулярні нітрозотіоли

мітохондріального матриксу (див. рис. 1), як відомо, відбувається активація мітохондріальних дегідрогеназ [22] і мітохондріальної NO-синтази (NOS) [12], що має призводити до початкового приросту вмісту АФК і АФА. Закономірним є припущення, що активація метаболізму останніх відбувається в міру збільшення накопичення  $Ca^{2+}$  у мітохондріях внаслідок пригнічення мітохондріальної пори оксидом азоту, який, імовірно, синтезується кальцій-залежними ізоформами мітохондріальної NOS (див. рис. 2). Відповідно зі збільшенням кальцієвої ємності мітохондрій (див. рис. 1), внаслідок активації дегідрогеназ, спостерігається підвищення вмісту АФК: гідропероксиду супероксид-аніона та гідроксил-радикала (див. рис. 4,б). Вміст стабільного метаболіту кисню, гідропероксиду збільшується від  $95,0 \pm 0,7$  до  $269,7$  нмоль/мг білка  $\pm 0,4$  нмоль/мг білка; одночасно різко зростає і швидкість утворення нестабільних АФК, супероксид-аніона та гідроксил-радикала. Значний приріст вмісту АФК, що відбувається разом зі збільшенням дози нітрогліцерину та надходження  $Ca^{2+}$  до мітохондрій, є вірогідною причиною посилення реакцій

окиснення АФА та збільшення відносного вмісту  $NO_3^-$  (див. рис. 3,б).

Натомість в аорті знижується загальний пул АФК із збільшенням дози нітрогліцерину до 1 мг/кг (див. рис. 4,а), що можливо відповідає загальному менш окисненому стану АФА, значному переважанню вмісту  $NO_2^-$  над  $NO_3^-$  і значно більшому відносному вмісту НМНТ порівняно з ізольованими мітохондріями (див. рис. 3,а). Так, вміст гідропероксиду в аорті за дії нітрогліцерину (1 мг/кг) знижується від  $44,1 \pm 3,3$  до  $4,1$  нмоль/мг білка  $\pm 0,7$  нмоль/мг білка. Одночасно знижується і швидкість утворення супероксид-аніона (див. рис. 4,а). Особливості метаболізму АФК в аорті, однак, полягають у тому, що на тлі зниження вмісту  $H_2O_2$  та  $O_2^-$  спостерігається одночасне реципрокне збільшення швидкості генерації високотоксичного  $\cdot OH$ -радикала (див. рис. 4,а). Однією з загальновідомих причин зниження вмісту АФК може бути активація антиоксидантних ферментів – каталази та супероксиддисмутази. Однак одержані результати, що вказують на вичерпання пулів  $H_2O_2$  та  $O_2^-$  та відповідне збільшення швидкості генерації  $\cdot OH$ -радикала, є свідченням не пригнічення, а навпаки – поси-

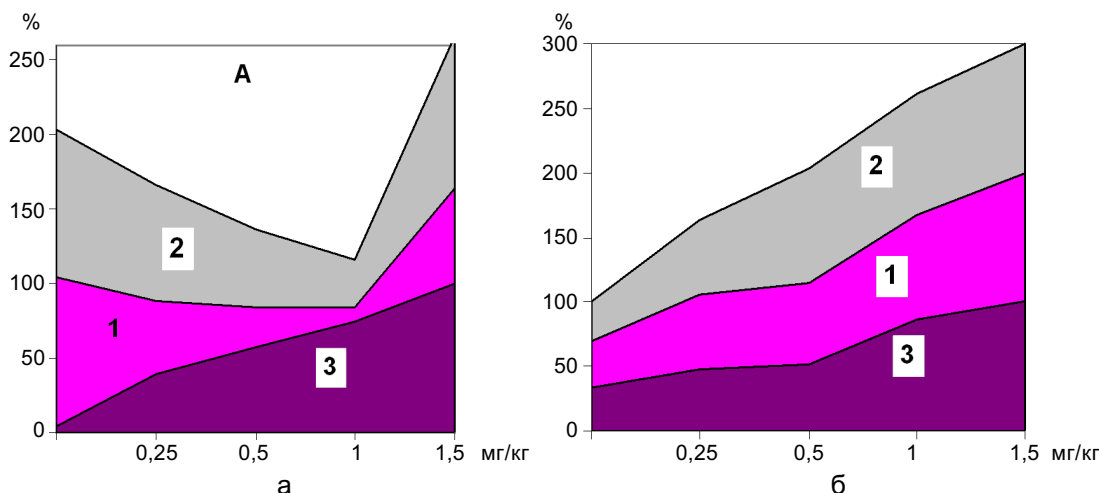
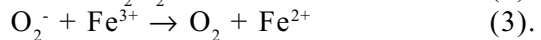
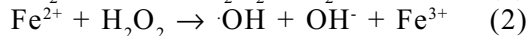
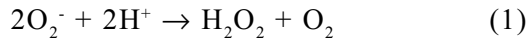


Рис. 4. Зміна вмісту активних форм кисню (АФК) в аорті (а) та мітохондріях міокарда (б) при дії нітрогліцерину (мг/кг). За 100 % приймали максимальне значення, встановлене для кожного із показників: 1 – гідропероксид; 2 – супероксид-аніон; 3 –  $\cdot OH$ -радикал. Діаграми не перекриваються між собою. Загальний вміст АФК за дії окремих доз нітрогліцерину (%) є сумою вмісту кожного з показників у відсотках від їх максимальних значень. Вміст  $\cdot O_2^-$  та  $\cdot OH$ -радикалів оцінювали за швидкістю їх утворення в умовних одиницях поглинання з розрахунку на 1 мг білка  $\cdot год^{-1}$

лення окисного неферментативного метаболізму АФК в аорті за дії донора NO. Для пояснення спостережуваних змін вмісту АФК в аорті щурів (див. рис. 4,а) як робочу гіпотезу можна висунути думку, що мітохондрії, і зокрема їх здатність до накопичення Ca<sup>2+</sup>, яка посилюється більш ніж удвічі при дії донора NO і призводить до посиленого споживання кисню, відіграють важливу роль у метаболізмі АФК у відповідь на дію NO також і в аорті, як, можливо, і в інших тканинах організму.

Так, за результатами, одержаними на ізольованих мітохондріях, спостерігається помітна кореляція між рівнем акумуляції Ca<sup>2+</sup> та вивільненням іонізованого заліза з мітохондрій, вміст якого підвищується від 0,12±0,01 до 6,23 нмоль/мг білка ± 0,71 нмоль/мг білка при збільшенні накопичення Ca<sup>2+</sup> від 38,2±6,2 до 110,0 нмоль/мг білка ± 8,0 нмоль/мг білка (рис. 5,а). При цьому за умов максимального накопичення Ca<sup>2+</sup> (1 мг/кг нітрогліцерину) вміст вільного заліза в мітохондріях також сягає максимуму та різко зменшується при подальшому зниженні вмісту Ca<sup>2+</sup> зі збільшенням дози нітрогліцерину до 1,5 мг/кг (див. рис. 5,а). Відомо, що залізо є каталізатором багатьох окисно-відновних реакцій за участю

кисню та його похідних, і зокрема – реакцій Хабер–Вайса з утворенням ·ОН-радикала з гідропероксиду. У цих реакціях залізо й само зазнає окисно-відновних перетворень, причому обидві форми заліза (як дво-, так і тривалентне) беруть участь у метаболізмі АФК:



Отже, можна припустити наступний вірогідний розвиток подій, що можуть відбуватися внаслідок значної акумуляції Ca<sup>2+</sup>, посиленої блокуванням мітохондріальної пори оксидом азоту.

Як відомо, акумуляція Ca<sup>2+</sup> у мітохондріях супроводжується вивільненням протонів з мітохондріального матриксу та закисненням позамітохондріального середовища [24]. Можливо, що посилене вивільнення протонів з матриксу та локальне закиснення цитозолу внаслідок збільшення накопичення Ca<sup>2+</sup> у свою чергу сприяє неферментативному розпаду супероксид-аніона з утворенням гідропероксиду (1). Взаємодія гідропероксиду з двовалентним залізом, пул якого зростає з надходженням Ca<sup>2+</sup> до матриксу мітохондрій (див. рис. 5), призводить до утворення гідроксил-ради-

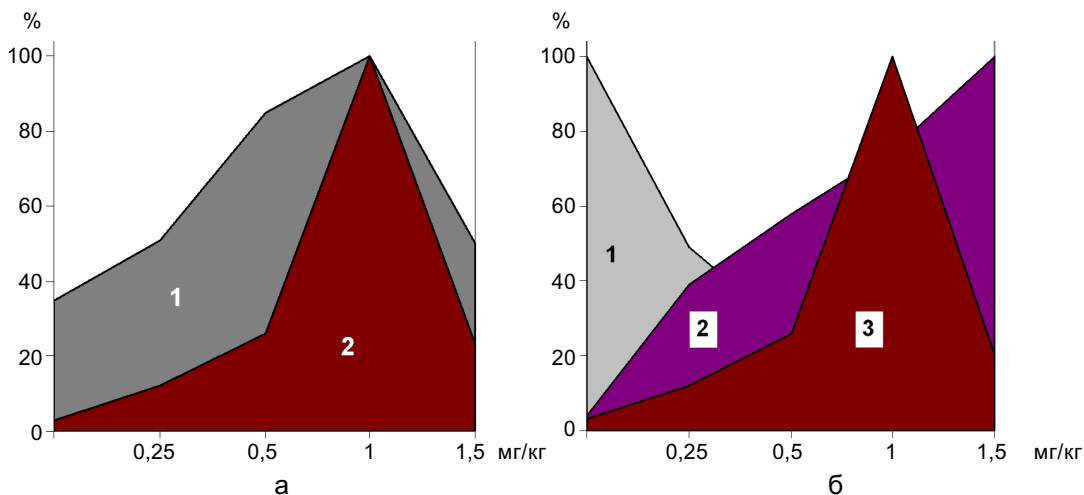
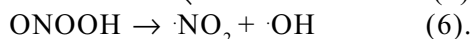
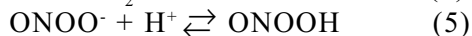


Рис. 5. Вплив різних доз нітрогліцерину на накопичення Ca<sup>2+</sup> (1) та вивільнення Fe<sup>2+</sup> (2) у мітохондріях серця щурів (а) та на зміну вмісту гідропероксиду (1), швидкість утворення ·ОН-радикала (2) в аорті та вивільнення Fe<sup>2+</sup> (3) в мітохондріях міокарда щурів (б).

За віссю абсцис: доза нітрогліцерину, за віссю ординат: зміна показників у відсотках від максимальних значень

кала (2), вміст якого збільшується в міру вичерпання пулу  $H_2O_2$  (див. рис. 5,б). І вже подальшим кроком, як можна припустити, є відновлення тривалентного заліза (продукту реакції (2)) супероксид-аніоном (3), що у свою чергу призводить до вичерпання пулу  $\cdot O_2^-$  (див. рис. 4,а) та регенерації заліза, яке знов каталізує розпад гідропероксиду (2), утворюючи свого роду замкнений цикл каталітичних реакцій розпаду гідропероксиду з наступним відновленням каталізатора (двовалентного заліза). На підтвердження висловленої думки, результати експерименту вказують на помітну кореляцію між накопиченням  $Ca^{2+}$  та вивільненням заліза (див. рис. 5,а); вивільненням заліза та утворенням  $\cdot OH$ -радикала (див. рис. 5,б); збільшенням вмісту  $\cdot OH$ -радикала та відповідним зниженням пулів  $H_2O_2$  та  $\cdot O_2^-$  (див. рис. 4,а; 5,б).

Зважаючи на вищесказане, можна припустити, що майже 50%-ве відносне зниження пулу нітрозильованих білків у мітохондріях міокарда (див.рис. 3,б) також зумовлене дозо-залежним збільшенням вмісту вільного заліза, під дією якого (як і під дією інших металів перехідної валентності, наприклад міді) може відбуватися розпад нітрозотіолів з вивільненням NO [5]. Цей пул NO, вивільнений із нітрозотіолів як тимчасового депо оксиду азоту, потенційно є токсичним і для мітохондрій, і для клітин у цілому як одне із суттєвих джерел пероксинітриту внаслідок взаємодії з АФК за такими перетвореннями [21]:



Вивільнений у великих кількостях пероксинітрит (4), як і гідропероксид (2), надалі також може стати джерелом  $\cdot OH$ -радикала (6), внаслідок вільнорадикального розпаду, вже без участі заліза, що, можливо, і відбувається в аорті та ізольованих мітохондріях за дії надто високих доз нітрогліцерину (1,5 мг/кг), за яких акумуляція  $Ca^{2+}$  у мітохондріях і вивільнення

заліза різко знижується (див. рис. 5,а,б), вірогідно, через сильне оксидативне ушкодження.

Отже, наведені міркування підводять до висновку, що саме вивільнення іонізованого заліза з мітохондрій внаслідок посиленої акумуляції  $Ca^{2+}$  під дією NO у фізіологічних умовах є поворотною подією у подальшому метаболізмі АФК і АФА та вірогідною причиною оксидативного стресу в аорті щурів. І хоча зроблені нами висновки на цей час мають дещо гіпотетичний характер, вони досить добре пояснюють значне інгібування  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФази аорти при дії великих доз нітрогліцерину, з одного боку,  $\cdot OH$ -радикалом, а з іншого, можливо, і пероксинітритом, який утворюється внаслідок декомпозиції ВМНТ під дією вільного заліза [5] і взаємодії вивільненого NO з АФК (4,5) [21]. Слід зазначити, що і саме залізо, внаслідок комплексоутворення з АТФ, є високоефективним інгібітором  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФази, причому також внаслідок генерації  $\cdot OH$ -радикала за наявності  $H_2O_2$  і розриву пептидних зв'язків, важливих для ферментативної активності [20].

Слід зазначити, що активність  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФази після її пригнічення високими дозами нітрогліцерину, за нашими даними [2], майже повністю (на 80 % від контролю) відновлюється мелатоніном, потужним антиоксидантом [9], що незаперечно вказує на оксидативну природу інгібіторної дії NO на  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазу в аорті щурів. Наші результати переконливо свідчать, що активність  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФази залежить від метаболічних перетворень як АФА, так і АФК, причому особливістю метаболізму АФК, стимульованого дією нітрогліцерину, є їх перерозподіл на користь утворення  $\cdot OH$ -радикала внаслідок активації реакцій Хабер–Вайсса, каталізованих вивільненими з мітохондрій іонами заліза, що призводить до посилення оксидативного стресу та інгібування  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФази, незважаючи на загальне зниження вмісту АФК в аорті щурів. Інгібування  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФази, маркер-



ного ферменту плазматичних мембран аорти, як показують результати проведеного експерименту, має виражену мітохондріальну «складову». Отже, регуляція мітохондріального транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  і блокування мітохондріальної пори оксидом азоту *in vivo* призводить до перерозподілу шляхів метаболічних перетворень АФК і АФА і до модуляції активності іонотранспортних систем плазматичної мембрани вільнорадикальними активними формами кисню й азоту мітохондріального походження. Швидка інактивація  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази продуктами біотрансформації нітрогліцерину NO, АФА та АФК, яка своїм зворотним боком може мати посилене надходження  $\text{Ca}^{2+}$  до клітин аорти та активацію кальцій-залежних сигнальних шляхів, є свідченням регуляторної ролі вільних радикалів в серцево-судинній системі на рівні мітохондріальної та плазматичної мембран.

**О.В. Акопова, А.В. Коцюруба, О.Н. Харламова, Ю.П. Коркач, В.Ф. Сагач**

#### **РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В NO-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФазы АОРТЫ КРЫС**

В опытах *in vivo* изучено взаимодействие двух ионотранспортных механизмов сердечно-сосудистой системы ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза аорты крыс и кальцийаккумулирующей системы митохондрий сердца) в краткосрочном ответе на введение донора NO, нитроглицерина (НГ). Активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы определяли в аорте, тогда как накопление  $\text{Ca}^{2+}$  – в изолированных митохондриях сердца, предполагая, что процессы метаболизма в митохондриях сердца под действием NO близки к таковым в митохондриях клеток аорты. Результаты эксперимента показывают дозозависимое скоординированное действие NO на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях. Активация  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы низкими дозами НГ сопровождается повышением накопления  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях вследствие подавления митохондриальной поры. Однако повышение дозы НГ (до 1 мг/кг) приводит к снижению активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы по сравнению с контролем. Накопление  $\text{Ca}^{2+}$ , напротив, возрастает и достигает максимума при введении 1 мг/кг НГ. Параллельно в митохондриях происходит резкое повышение уровня содержания активных форм кислорода (АФК), активных форм азота (АФА), их токсичных производных – нитрозотиолов и свободного железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Наблюдается

соответствие между накоплением  $\text{Ca}^{2+}$ , высвобождением  $\text{Fe}^{2+}$  и повышением уровня  $\cdot\text{OH}$ -радикала, при исчерпании пулов  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{O}_2^-$  в аорте и нитрозотиолов в митохондриях. По нашему мнению, особенностью метаболизма АФК в аорте в ответ на действие NO является их перераспределение в пользу  $\cdot\text{OH}$ -радикала за счет пулов  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\cdot\text{O}_2^-$  вследствие активации реакций Хабер–Вайсса, катализируемых ионами железа, и свободнорадикального разложения пероксинитрита, источником которого служит митохондриальный пул нитрозотиолов. Таким образом, эксперимент выявляет важную роль митохондрий в индуцируемой ионами  $\text{Fe}^{2+}$  активации свободнорадикальных превращений АФК и АФА, ведущих к усилению оксидативного стресса и ингибированию  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в аорте крыс. Восстановление активности фермента мощным антиоксидантом мелатонином, свидетельствует об оксидативной природе угнетения  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы оксидом азота в аорте крыс.

Ключевые слова:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза, аорта, кальциевая емкость, митохондрии миокарда, АФК, АФА, оксидативный стресс.

**O.V. Akopova, A.V. Kotsiuruba,  
O.N. Kharlamova, Yu.P. Korkach, V.F. Sagach**

#### **THE ROLE OF MITOCHONDRIA IN THE NO-DEPENDENT REGULATION OF $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase ACTIVITY IN RAT AORTA**

In experiments *in vivo* we studied the interaction between two ion-transporting mechanisms of cardiovascular system -  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase of rat aorta and  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake system of mitochondria in short-term response to different doses of NO donor, nitroglycerine (NG). The activity of the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase was determined in rat aorta, and mitochondrial uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  was studied in rat heart mitochondria assuming that metabolism induced by NO in cardiac mitochondria is similar to that in rat aortic mitochondria. The data show a coordinated dose-dependent action of NG on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity as well as  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake in mitochondria. An activation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase by low dose of NG (0,25 mg/kg body weight) is accompanied by the activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake in mitochondria as a result of inhibition of permeability transition pore. However, further increase of the dose of the drug leads to reciprocal changes of studied parameters: the decrease in  $\text{Na}^+$ -pump activity below the control level and the increase of  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake in mitochondria with a peak at 1,0 mg/kg NG, which takes place in parallel with the dramatic rise in the level of ROS and RNS together with their toxic products, nitrosothiols (NT) and free iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) content in mitochondria. Strong correlation between  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake and  $\text{Fe}^{2+}$ -release,  $\text{Fe}^{2+}$ -release and  $\cdot\text{OH}$ -radical formation, the rise in  $\cdot\text{OH}$ -radical level and the decrease of that of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and mitochondrial NT together with the inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase favor a hypothesis that oxidative stress in rat aorta is of mitochondrial origin due to an enhanced uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  into mitochondrial matrix,  $\text{Fe}^{2+}$  deliverance and manifold increase in  $\cdot\text{OH}$ -radical formation from decomposi-

tion of hydroperoxide in Haber-Weiss reaction and the decomposition of mitochondrial NT via formation of peroxynitrite, both catalysed by  $\text{Fe}^{2+}$ , with subsequent release of  $\cdot\text{OH}$ -radical. Effective abolition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibition by potent antioxidant melatonin gives the evidence of the oxidative nature of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibition by nitric oxide in rat aorta. Key words:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, aorta,  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake, heart mitochondria, ROS, RNS, oxidative damage.

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

*A.V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Акопова О.В., Коцюруба А.В., Ткаченко Ю.П., Сагач В.Ф. Оксид азоту пригнічує відкриття мітохондріальної пори і збільшує кальцієву ємність мітохондрій *in vivo* // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, №3. – С. 3–11.
- Акопова О.В., Харламова О.М., Коцюруба А.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Вплив оксиду азоту на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу в тканині аорти щурів // Там само. – 2009. – **55**, №1. – С.27–35.
- Акопова О.В. Роль мітохондріальної пори в трансмембранному обміні кальція в мітохондріях // Укр.біохім. журн. – 2008. – **80**, №3. – С.40–47.
- Болдырев А.А.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза как олигомерный ансамбль // Биохимия. – 2001. – **66**. – С.1013–1025.
- Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биологических системах // Биохимия, 1998. – **63**, №7. – С.924–938.
- Коркач Ю.П., Дудченко Н.О., Коцюруба А.В., Присяжна О.Д., Сагач В.Ф. Роль негемового заліза у протекторній дії екдистерону на розвиток стрептозототин-індукованої гіпоглікемії у щурів // Укр.біохім. журн. – 2008. – **80**, №1. – С.46–51.
- Костюк П.Г., Костюк О.П., Лук'янець О.А. Иони кальцію у функції мозку – від фізіології до патології. – К.: Наук. думка. – 2005. – 198 с.
- Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. – М.: Наука, 1989. – 564 с.
- Acuna-Castroviejo D., Martin M., Macias M., Escames G., Leon J., Khaldy H., Reiter R.J. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics // J. Pineal Res. – 2001. – **30**. – P.65–74.
- Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals // Cell Biol. – 1990. – **68**, №5. – P.989–998.
- Blaustein M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and cell responsiveness // Amer. J. Physiol. – 1993. – **264**. – P. C1367–C1387.
- Brown G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration // Biochim. Biophys. Acta. 1999. – **1411**. – P.351–369.
- Conte D., Narindrasorosa K.S., Sarcar B. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generated free radicals and caused DNA damage // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, №9. – P.5125–5130.
- Daiber A., Wenzel P., Oelze M., Schuhmacher S., Jansen T., Munzel T. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) – maker of and marker for nitrate tolerance in response to nitroglycerine treatment // Chem. Biol. Interact. – 2009. – **178**, №1-3. – P. 40–47.
- Frieden M., James D., Castelbou C. Danckaert A., Martinon J.-C., Demareux N. Calcium homeostasis during mitochondrial fragmentation and perinuclear clustering induced by hFis1 // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**. – P.22704–22714.
- Green L.C., David A.W., Glogovski J. Analysis of nitrate, nitrite and [ $^{15}\text{N}$ ]nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, №1. – P.131–138.
- Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /iodide system // Eur. J. Biochem., 1984. – **141**, №1. – P. 69–74.
- Ignarro L.J., Napoli C., Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide // Circulat. Res. – 2002. – **90**, №1. – P.21–28.
- Lander H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction // FASEB J. – 1997. – **11**. – P.118–124.
- Patchornik G., Goldshleger R., Karlsh S.J.D. The complex  $\text{ATP-Fe}^{2+}$  serves as a specific affinity cleavage reagent in  $\text{ATP-Mg}^{2+}$  sites of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase: altered ligation of  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Mg}^{2+}$ ) ions accompanies the  $\text{E}_1\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{P}$  conformational change // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – **97**, №22. – P.11954–11959.
- Pfeiffer S., Gorren A.C.F., Schmidt K., Wermer E.R., Hansert B., Bohle D.S., Mayer B. Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in 2:1 stoichiometry // J. Biol. Chem. – 1997. – **272**, №6. – P.3465–3470.
- Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game // J. Physiol., 2000. – **529**, №1. – P. 37–47.
- Rizzuto R., Pinton P., Carrington W., Fay F.S., Fogarty K.E., Lifshitz L.M., Tuft R.A., Pozzan T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  responses // Science. – 1998. – **280**. – P.1763–1766.
- Rossi C.S., Bielawsky J., Lehninger A.L. Separation of  $\text{H}^+$  and  $\text{OH}^-$  in the extramitochondrial and mitochondrial phases during  $\text{Ca}^{2+}$ -activated electron transport // J. Biol. Chem. – 1966. – **241**, №8. – P.1919–1921.

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

*In-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ*

*E-mail: circula@biph.kiev.ua; ruba@biochem.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до редакції 02.06.2009*