

Р.Р. Шаріпов, А.В. Коцюруба, Б.С.Коп'як, В.Ф. Сагач

Індукція нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів за експериментальної ішемії–реперфузії головного мозку та його корекція екдистероном

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; E-mail: Egiptian77@gmail.com

*На моделі фокальної ішемії–реперфузії головного мозку досліджували індукцію нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів і можливі механізми протекторної дії екдистерону. Показано, що в цих умовах індукується активація конститутивного та індукційного de novo синтезу NO внаслідок окиснення L-аргініну та неокисного реутилізаційного синтезу NO внаслідок відновлення його окиснених стабільних метаболітів. Вагомим доказом індукції нітрозативного стресу було значне зростання мітохондріальних пулів нітрат-, нітрит-аніонів і нітрозотіолів, що свідчить про утворення та розпад пероксинітриту – основного маркера розвитку нітрозативного стресу. Спостерігали також підвищення вмісту ключового регулятора de novo синтезу NO сірководню й активності індукційної аргінази II та, як наслідок, пулу карбаміду. Попереднє введення тваринам рослинного екстакту *Serratula coronata*, збагаченого екдистероном, зменшує індукцію нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів за умов фокальної ішемії–реперфузії.*

Ключові слова: фокальна ішемія–реперфузія головного мозку, цереброкардіальний синдром, мітохондрії серця, нітрозативний стрес, екдистерон.

ВСТУП

Згідно з офіційною статистикою, внаслідок мозкового інсульту в Україні щорічно помирає від 40 до 45 тис. осіб. Однією з найважливіших проблем сучасної неврології є терапія ускладненого перебігу ішемічного інсульту. Насамперед це стосується функціональних змін серцево-судинної системи в гострому періоді захворювання. Цю патологію можна розглядати не тільки як неврологічну, але і як мультидисциплінарну проблему, в якій серце і головний мозок мають два взаємопов'язаних аспекти: з одного боку – це інсульт, що розвивається в результаті захворювань серця, з іншого – кардіальна дисфункція при гострому його перебігу, яка сприяє ранній смертності хворих [1]. Ця дисфункція, або цереброкардіальний синдром, описана близько 60 років тому, і може

проявлятися в діапазоні від різних варіантів порушення серцевого ритму до розвитку гострого інфаркту міокарда [2]. Провідною ланкою розвитку цереброкардіального синдрому є гістотоксичне ураження міокарда внаслідок гіперкатехоламінемії, збільшується вхід Ca^{2+} в кардіоміоцити, в яких виникають вторинні морфофункціональні зміни («адреналіновий міокардит») [3]. Важливо, що при ішемії мозку мікроглія продукує токсичні прозапальні цитокіни, які збільшують набряк головного мозку, розмір інфарктної зони, а в серці – впливають на міокард через ендотеліальні клітини та кардіоміоцити [4]. Інтерлейкін-1 (ІЛ-1), фактор некрозу пухлин (ФНП- α) та γ -інтерферон активують транскрипцію гена кальційнезалежної індукційної NO-синтази (iNOS), що призводить до надлишкового синтезу оксиду азоту (NO) при ішемічному інсульті. Активація конститутивних NO-

© Р.Р. Шаріпов, А.В. Коцюруба, Б.С.Коп'як, В.Ф. Сагач

синтаз (eNOS, nNOS), на відміну від iNOS, здійснюється транзиторно внаслідок підвищення внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} та активації протеїнкінази B, яка в свою чергу контролюється сфінгомієліновим сигнальним каскадом [5]. Останній здатний активуватися ФНП- α стероїдним гормоном кальцитриолом та його природним аналогом екдистероном [6].

Гіперкатехоламінове гістотоксичне ураження міокарда [7], токсичний вплив прозапальних цитокінів мікроглії мозку, доведений факт розвитку потужного оксидативного стресу в мітохондріях серця за фокальної ішемії–реперфузії [8] дає підстави припустити також можливий розвиток нітрозативного стресу при цереброкардіальному синдромі. Ще одне припущення стосується можливої участі в процесах, які відбуваються в мітохондріях міокарда біологічно активного газового трансмітера сірководню (H_2S), що відіграє суттєву роль як у фізіологічних реакціях, так і при розвитку багатьох патологічних станів. Сірководень інтенсивно синтезується в мітохондріях людини і тварин, бере участь в реакціях з активними формами кисню та азоту ($\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , ONOO^- , NO) [9], є важливим регулятором *de novo* синтезу NO [10, 11].

Екдистерон є природним аналогом гормональної форми вітаміну D_3 – кальцитриолу (1,25-дигідроксихолекальциферолу). Він здатний активувати не лише цитозольні так звані „ядерні” рецептори, запускаючи експресію багатьох відомих залежних від вітаміну D генів (у т.ч. мітохондріального Ca і NO -зв’язувального білка „calbindin D-28K”), але й активувати різні сигнальні системи (фосфатидилінозитольну, фосфатидилхолінову, сфінгомієлінову, холестеролову, аденілат- і гуанілатциклазні тощо), взаємодіючи з рецепторами плазматичних мембран клітин у серці і головному мозку щурів. Екдистерон здатний інгібувати як кальційзалежне, так і залежне від активних форм кисню (АФК) відкривання мітохондріальної пори [12], інгібує активність iNOS, нітратредуктази та аргінази II в мітохон-

дріях серця щурів, що було показано на моделі експериментального діабету 1-го типу [13].

Мета нашої роботи – дослідити скоординовані зміни маркерів нітрозативного стресу (активність iNOS, пулів нітрозотіолів і нітрат-аніона) та пулів H_2S , а також ефективність кардіопротекторної дії екдистерону у мітохондріях серця щурів за фокальної ішемії–реперфузії.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на щурах лінії Вістар масою 280–320 г, згідно з вимогами Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986). Тварин поділили на чотири групи. До 1-ї (контрольної) групи ($n=8$), увійшли інтактні тварини. Щурам 2-ї групи моделювали фокальну ішемію–реперфузію ($n=8$, через 24 год, $n=5$, 3 тварини загинули). Тварини 3-ї і 4-ї (по 8 щурів) груп протягом 18 діб отримували екдистерон по 100 мкг/100 г на добу, з питною водою у вигляді препарату «Біоспон» (екстракт екдистерону з рослини *Serratula coronata*). Тваринам 4-ї групи після введення екдистерону оперативно моделювали фокальну ішемію–реперфузію.

Оскільки ішемічний інсульт часто викликається оклюзією середньої мозкової артерії або однієї з її гілок, для дослідження була обрана модель ізольованої оклюзії – МСАО (від англ. middle cerebral artery occlusion) [14]. Його відтворювали оперативним шляхом під наркозом (кетамін 75 мг/кг, внутрішньоочеревинно). У внутрішню сонну артерію вводили монофіламентний оклюдер 4/0 («Docol corp.», США), який потрапляв у просвіт передньої мозкової артерії та блокував середню мозкову артерію. Оклюзію здійснювали протягом 60 хв, потім оклюдер видаляли. Після пробудження тварин перевіряли наявність фокального ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку. Для цього щура утримували за хвіст на відстані 1–2 см від поверхні. У нормі щури симетрично витягують обидві кінцівки у напрямку до підлоги.

При наявності фокального ішемічно-реперфузійного пошкодження визначається тонічна флексія контралатеральної передньої лапи. Тварин, у яких цей феномен не спостерігався, в дослід не брали.

Біохімічні показники визначали в мітохондріях серця контрольних тварин 1-ї і 3-ї груп, а також через 24 год фокальної ішемії–реперфузії у тварин 2-ї та 4-ї групи, що вижили, які виділяли після декапітації з тканин серця послідовним центрифугуванням гомогенату. Осад мітохондрій суспендували у невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА та негайно заморожували. В ізольованих мітохондріях серця визначали показники, що характеризують метаболізм оксиду азоту (активність ферментів *de novo* і реутилізаційного шляхів його синтезу, пули стабільних метаболітів), ступінь розвитку нітрозативного стресу (мітохондріальні пули нітрозотіолів), активність аргінази, що конкурує за субстрат із синтазами NO, вміст сірководню.

Вивчали базальну активність ферментів *de novo* синтезу оксиду азоту. Активність кальційзалежних конститутивних (сNOS=eNOS+NOS) та кальційнезалежної iNOS оцінювали за комбінацією класичного методу [15] та сучасної його модифікації [16], пристосованою до спектрофотометричного визначення одного з продуктів реакції L-цитруліну. Активність ферментів виражали в пікомолях новоутвореного L-цитруліну за 1 хв у розрахунку на 1 мг загального білка в пробі. Вміст цитруліну вимірювали високочутливим колориметричним методом [17]. Активність НАДНФ-залежної нітратредуктази, що характеризує інтенсивність неокисного реутилізаційного синтезу NO, вивчали за зменшенням вмісту нітрат-аніона в інкубаційному середовищі [18], аргіназну – стандартним методом за утворенням карбаміду в інкубаційній суміші, що містила L-аргінін і аліквоти проб в тріс-НCl (фірма “Calbiochem”) буфері (рН 8,0) [19], вміст карбаміду – колориметричним монооксимним методом у безбілкових розчинах за допомогою добірки

реактивів фірми «Філісіт-Діагностика», м. Дніпропетровськ, Україна. Мітохондріальні пули нітрит-аніона досліджували за допомогою реактиву Гріса [20], нітрат-аніона – за допомогою бруцину фірми «Sigma», США [21], а вміст високо- і низькомолекулярних нітрозотіолів – за методом Saville [22], суть якого полягає у вивченні вмісту додаткового нітрит-аніона після гідролізу S–NO-зв'язку катіонами двовалентної ртуті. Для визначення вмісту H₂S, до аліквот проб додавали 0,5 мл 1%-го розчину ацетату цинку, інкубували при 37°C протягом 10 хв, потім додавали 0,5 мл 20 ммоль/л розчину N,N-DPD (N,N-dimethyl-p-phenylenediamine, «Sigma», США) та 0,5 мл 30 ммоль/л розчину FeCl₃. Після цього в темноті на холоді вимірювали оптичну густину при λ=670 нм [23]. Вміст загального білка в суспензії мітохондрій вимірювали за методом Лоурі [24].

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), SDUDENT (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Мітохондріальна NOS кардіоміоцитів, локалізована у внутрішній мембрані мітохондрій, продукує як оксид азоту за наявності аргініну, так і супероксидний аніон-радикал ($\cdot\text{O}_2^-$) – за дефіциту аргініну або кофактора тетрагідробіоптерину. NO в низьких концентраціях, як і АФК, є фізіологічним модулятором в мітохондріях, що регулює споживання кисню, синтез аденозинтрифосфату і транспорт Ca²⁺. Надмірне ж накопичення активних форм азоту (АФА) – оксиду азоту, діазоттриоксиду (N₂O₃), пероксинітриду (ONOO⁻) і, особливо, одного з продуктів його деградації за вільнорадикальним механізмом – радикала діоксиду азоту ($\cdot\text{NO}_2$), порушує вищезгадані процеси внаслідок розвитку нітрозативного стресу [25].

У більшості випадків пошкоджувальна дія NO опосередковується пероксинітридом, який утворюється при одночасній генерації

високого вмісту як NO, так і $\cdot\text{O}_2^-$. Крім того, високий вміст оксиду азоту пригнічує активність каталази, що збільшує вміст H_2O_2 і кальційзалежних NOS, у тому числі мітохондріальної, що призводить до утворення нею $\cdot\text{O}_2^-$ замість NO [26].

У таблиці представлено абсолютні значення досліджених показників в мітохондріях серця щурів, а на рис. 1–4, значення показників виражено у відсотках відносно контрольної групи, що були прийняті за 100 %.

Через 24 год після моделювання фокальної ішемії–реперфузії (рис. 1), в мітохондріях серця щурів спостерігається синтез NO із L-аргініну киснезалежним шляхом *de novo*, про що свідчить значне збільшення активності конститутивної NOS (сNOS) та iNOS порівняно з тваринами контрольної групи. У тварин 4-ї групи, які перед моделюванням фокальної ішемії–реперфузії отримували

екдистерон, підвищення активності сNOS та iNOS порівняно зі щурами 2-ї групи не спостерігалось. Вона наближалася до значень активності ферментів у мітохондріях 1-ї та 3-ї груп. Після фокальної ішемії–реперфузії в мітохондріях серця активізується система газового трансмітера NO. Зростає синтез NO *de novo*, що може призвести до збільшення вмісту АФА і, що особливо небезпечно, пероксинітриду, бо в цих умовах значно підвищується генерація АФК, в т.ч. необхідного для його утворення $\cdot\text{O}_2^-$. Отже, посилення активності iNOS, що має значно більшу продуктивність синтезу NO, ніж сNOS, за умов підвищення вмісту $\cdot\text{O}_2^-$ може призводити до утворення пероксинітриду та подальшої активації процесів нітрозативного стресу та апоптозу. Екдистерон інгібує активацію синтезу NO *de novo*, тим самим зменшує ймовірність утворення АФА.

Абсолютні значення досліджуваних показників у мітохондріях серця щурів при ішемії–реперфузії та введення протягом 18 діб екдистерону ($M \pm m$)

Показник	Контроль (n=8)	Ішемія–реперфузія (n=5)	Екдистерон (n=8)	Екдистерон та ішемія–реперфузія (n=8)
Активність NOS, $\mu\text{моль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка				
конститутивної	3,62 \pm 0,21	14,24 \pm 1,83*	3,2 \pm 0,09	4,1 \pm 0,77**
індуцибельної	1,52 \pm 0,19	5,01 \pm 0,75*	1,31 \pm 0,04	1,68 \pm 0,3**
Нітратредуктазна активність, $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	0,49 \pm 0,11	1,58 \pm 0,2*	0,31 \pm 0,01	0,4 \pm 0,07**
Вміст				
NO_2^- (пмоль/мг білка)	347,3 \pm 36,37	1242,93 \pm 170,27*	382,03 \pm 71,7	331,6 \pm 40,01**
NO_3^- (нмоль/мг білка)	68,9 \pm 5,53	211,98 \pm 33,13*	17,37 \pm 2,63	105,45 \pm 16,05**
низькомолекулярних нітрозотіолів	259,9 \pm 27,6	889,14 \pm 170,3*	225,21 \pm 15,53	290,59 \pm 37,09**
високомолекулярних нітрозотіолів	164,4 \pm 28,9	1033,8 \pm 91,21*	159,26 \pm 9,15	465,28 \pm 100,18**
Активність аргінази II, $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка	1,18 \pm 0,1	8,21 \pm 1,5*	0,39 \pm 0,07	0,56 \pm 0,11**
Вміст карбаміду, нмоль/мг білка	6,1 \pm 0,8	134,07 \pm 10,59*	10,18 \pm 1,44	21,71 \pm 3,36**
Вміст H_2S , нмоль/мг білка	4,21 \pm 0,34	10,94 \pm 1,7*	3,71 \pm 0,39	2,79 \pm 0,6**

* $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно фокальної ішемії–реперфузії головного мозку.

Крім киснезалежного *de novo* синтезу NO (окиснення L-аргініну) в умовах гіпоксії значно активується киснезалежний реутилізаційний шлях утворення NO (відновлення нітрату нітратредуктазою до нітриту, а останнього нітритредуктазою до NO). Ми дослідили в мітохондріях серця сумарну НАДНФ-залежну нітратредуктазну активність. Відомо, що основними продуцентами реутилізаційного NO ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$) в мітохондріях є цитохром С-оксидаза та ксантиноксидаза [27]. Отримані результати (див. рис. 1) вказують на посилення нітратредуктазної активності, а, отже, і реутилізаційного синтезу NO в мітохондріях серця тварин 2-ї групи порівняно з контролем. У тварин 4-ї групи активність нітратредуктази не збільшується. Інтенсифікація нітратредуктазного (діє лише в умовах гіпоксії) реутилізаційного синтезу NO із його стабільних метаболітів (NO_2^- та NO_3^-) за умов фокальної ішемії–реперфузії вказує на порушення оксигенації міокарда. Високий вміст NO, що утворюється в цих умовах, може бути причиною значного підвищення вмісту пероксинітриту [28]

і рівнів генерації таких радикалів, як $\cdot\text{NO}_2$ (чинник нітрозативного стресу), так і $\cdot\text{OH}$ (чинник оксидативного стресу), які є продуктами вільнорадикального шляху розпаду пероксинітриту і ініціаторами перекисного окиснення ліпідів.

Отже, не виключено, що за умов розвитку цереброкардіального синдрому, в мітохондріях серця виникає дефіцит кисню, який зумовлює значне посилення реутилізаційної генерації NO. Ці зміни синтезу NO не відбувалися при попередньому введенні гормону екдистерону – регулятора синтезу в мітохондріях кальційзв'язувального білка (calbindin D28K), а в плазматичних мембранах кардіоміоцитів кальційселективного каналу TRPV6 та активатора багатьох сигнальних каскадів, у т.ч. сфінгомелінового [13], що є ключовим регулятором програм виживання і апоптозу кардіоміоцитів.

Досліджуючи прояви нітрозативного стресу у мітохондріях серця щурів за експериментальної фокальної ішемії–реперфузії та кардіопротекторної дії екдистерону, ми також визначали зміни пулів стабільних метаболітів

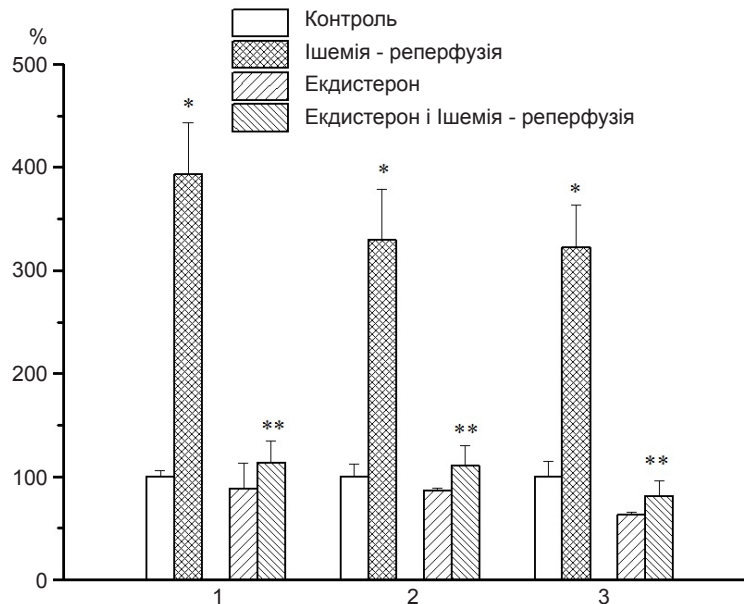


Рис. 1. Активність ферментів різних шляхів генерації NO в мітохондріях серця, за умов фокальної ішемії–реперфузії та дії екдистерону. 1 – конститутивна NOS; 2 – індукцибельна NOS; 3 – нітратредуктаза. *P<0,05 відносно контролю; **P<0,05 відносно фокальної ішемії–реперфузії

NO: NO_2^- , NO_3^- (рис. 2) та продуктів нітрозилування АФА низькомолекулярних тіолів, в основному глутатіону – низькомолекулярних (НМНТ) і високомолекулярних нітрозотіолів (ВМНТ), що є продуктами нітрозилування SH-груп цистеїну в білках (рис. 3). У мітохондріях серця тварин 2-ї групи достовірно зростали пули NO_2^- та NO_3^- порівняно з контролем (див. рис. 2). У тварин 3-ї групи вміст нітритів достовірно не змінювався, а нітратів, що є продуктом нерадикального розпаду пероксинітриту, зменшився в декілька разів порівняно з тваринами контрольної групи (див. рис. 2). В 4-й групі тварин, вміст нітритів не змінився, хоча вміст нітратів достовірно збільшився порівняно зі щурами 3-ї групи. На відміну від тварин 2-ї групи, у тварин 4-ї групи вміст нітритів і нітратів достовірно менші. Особливо несподіваним було значне підвищення пулів нітриту у тварин 2-ї групи. Як правило, в умовах патології, чи при старінні вміст нітриту знижується, що, власне, часто є головною причиною дисфункції мітохондрій органів. Враховуючи існуючий *de novo* синтез H_2S у мітохондріях серця, а також його антиоксидантну дію, в тому числі

взаємодію з пероксинітритом, стає зрозумілим, що поява надлишкового нітрит-аніона, більше того, і зростання мітохондріальних пулів H_2S (рис. 4) можуть бути зумовлені взаємодією сірководню з пероксинітритом. Це може бути ще одним (крім зростання мітохондріальних пулів нітрат-аніона і нітрозотіолів (див. рис. 2, 3) доказом значного утворення пероксинітриту, а, отже, свідченням розвитку нітрозативного стресу у мітохондріях серця за ішемії–реперфузії.

Нітрат-аніон є найбільш окисненим стабільним метаболітом NO, а також субстратом нітратредуктази для ресинтезу NO [29]. За умов ішемії–реперфузії значно підвищуються пули нітрату у мітохондріях серця. В умовах гіпоксії утворення нітрат-аніона при ферментативному окисненні NO є мало-вірогідним. Водночас частка його утворення при спонтанній деградації пероксинітриту зростає [30]. Враховуючи ці факти, а також те, що пероксинітрит утворюється лише при одночасній генерації як NO, так і $\cdot\text{O}_2^-$ підвищення вмісту нітрат-аніона у мітохондріях серця за умов ішемії–реперфузії, свідчить не лише про активацію синтезу NO, тобто

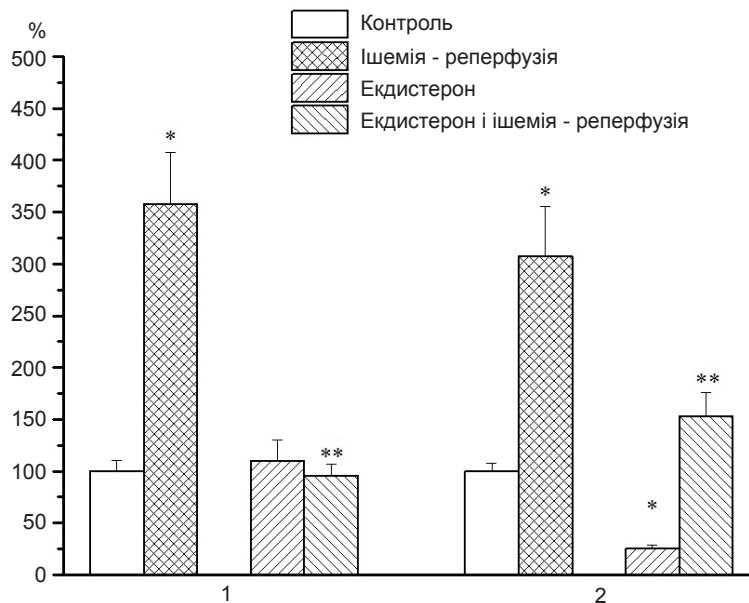


Рис. 2. Пули нітрит-аніона (1) та нітрат-аніона (2) в мітохондріях серця, за умов фокальної ішемії–реперфузії та дії екдистерону. * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно фокальної ішемії–реперфузії

розвиток нітрозативного стресу, але також про активацію генерації супероксидного аніона (що неминуче призводить до утворення H_2O_2 і $\cdot OH$). Отже, одночасно з нітрозативним, за ішемії–реперфузії у мітохондріях серця розвивається і оксидативний стрес [8].

Вміст маркерів нітрозативного стресу, якими є нітрозотіоли, змінювався аналогічно пулам NO_2^- та NO_3^- (див. рис. 3).

За умов ішемії–реперфузії у мітохондріях серця зростають пули НМНТ (які є в основному нітрозоглутатіоном), а, отже, можуть знижуватися мітохондріальні пули самого глутатіону – потужного низькомолекулярного антиоксиданта. Також зростають пули ВМНТ (нітрозильовані білки), при цьому певним чином змінюються функції цих білків мітохондрій, що, подібно до фосфорилування, є проявом сигнальної функції АФА (див. рис. 3). Нітрозотіоли – ендогенні донори NO, а також його депо. У процесі їх декомпозиції може звільнятися NO, причому як ферментативно, так і неферментативно. Зміни вмісту нітрозотіолів у мітохондріях серця за умов ішемії–реперфузії вказують на дві можливі причини їх виникнення: з одного боку – зро-

стання їх утворення (процес нітрозилування за дії різних АФА, особливо пероксинітриду), а з іншого — про пригнічення процесу їх декомпозиції.

Досліджуючи активність неокисного метаболізму L-аргініну та L-цистеїну у мітохондріях серця за умов ішемії–реперфузії, визначали активність індукцибельної аргінази II – основного ізоферменту мітохондрій, а також мітохондріальні пули карбаміду (один із продуктів аргіназної реакції гідролізу L-аргініну) і вміст H_2S (утворюється в мітохондріях за допомогою неокисного de novo синтезу із L-цистеїну).

Як відомо, потужна мітохондріальна аргіназа II (аргіназний неокисний метаболізм L-аргініну) може конкурувати із мітохондріальними ізоферментами cNOS (окисним метаболізмом L-аргініну). В умовах гіперпродукції NO та можливої нестачі субстрату L-аргініну (за високої активності його деградації аргіназою), кальційзалежні cNOS (як eNOS, так і nNOS) замість NO можуть інтенсивно генерувати супероксид-радикал, тим самим підсилюючи утворення пероксинітриду. Активність аргінази в міто-

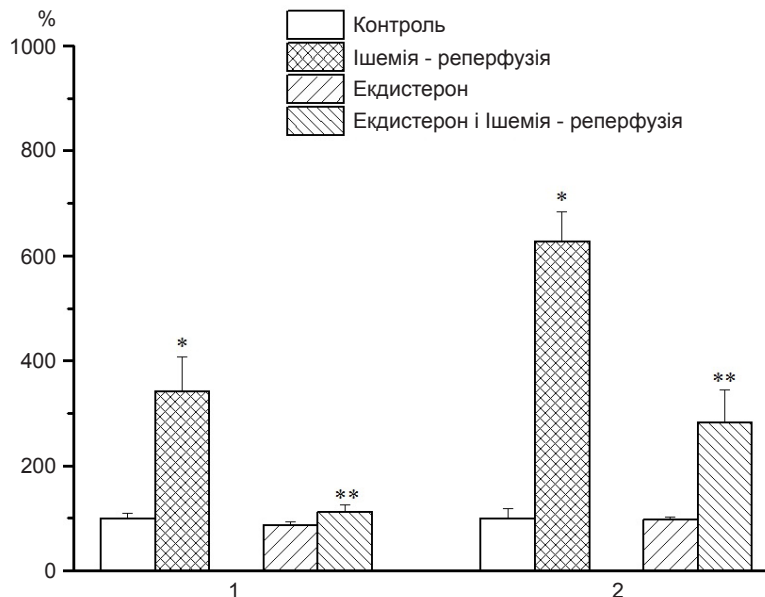


Рис. 3. Пули нітрозотіолов у мітохондріях серця за умов фокальної ішемії–реперфузії та дії екдистерону. 1 – низькомолекулярні; 2 – високомолекулярні нітрозотіоли. *P<0,05 відносно контролю; **P<0,05 відносно фокальної ішемії–реперфузії

хондріях серця тварин 2-ї групи достовірно збільшилася порівняно з контролем, а у тварин 3-ї та 4-ї групи – не підвищилася навіть за умов фокальної ішемії–реперфузії (див. рис. 4). Вміст карбаміду достовірно збільшився в мітохондріях тварин 2-ї групи відносно контролю. У тварин 4-ї групи його вміст достовірно більший, ніж у контролі, але значно нижчий порівняно з тваринами 2-ї групи (див. рис. 4).

Таким чином, одним із можливих механізмів кардіопротекторної дії екдистерону є нормалізація синтезу NO в мітохондріях із ферментом iNOS (що не конкурує з аргіназою за субстрат, позаяк використовує механізм ресинтезу свого субстрату L-аргініну виключно із копродукту синтезу NO L-цитруліну) внаслідок інгібування активності мітохондріальної аргінази II. Причини таких взаємин ще невідомі, однією з яких може бути інгібування активуючого ферменту iNOS його вільнорадикального окиснення через обмеження перетворення H_2O_2 в $\cdot OH$ -радикал у реакціях Хабера–Вайса чи Фентона. Це відбувається

внаслідок інгібування генерації $\cdot OH$ -радикала внаслідок хелатування вільного заліза карбамідом, копродуктом аргіназної реакції. Але більш вірогідним є інгібування iNOS гуанідіносукцинатом, попередником якого може бути карбамід (це рідкісна, поряд з реакцією карбаміювання, реакція прямого включення молекул карбаміду в обмін речовин) внаслідок прямого інгібування ресинтезу L-аргініну із L-цитруліну в т.з. цитруліновому циклі [31].

Як відомо, карбамід – це один із продуктів аргіназної реакції разом із орнітином, який у мітохондріях переважно метаболізується в глутамінову кислоту. Остання використовується для утилізації в циклі трикарбонових кислот. Встановлено здатність фізіологічних концентрацій сечовини карбаміювати різні білки, що змінює їх властивості. Не виключено, що підвищення чутливості мітохондріальної пори до її індукторів у серці старих шурів частково опосередковується саме карбаміюванням певних білків цього надзвичайно складного мультибілкового

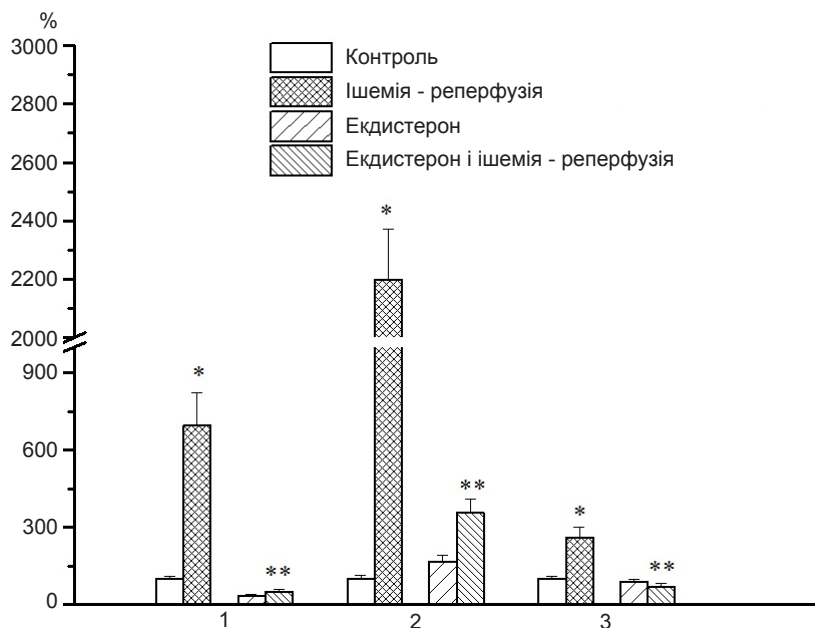


Рис. 4. Активність неокисного метаболізму L-аргініну та L-цистеїну в мітохондріях серця за умов фокальної ішемії–реперфузії та дії екдистерону. 1 – аргіназа; 2 – карбамід; 3 – H_2S . * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно фокальної ішемії–реперфузії

комплексу. У такому разі, пригнічувальний вплив екдистерону щодо активності мітохондріальної аргінази (див. рис.4) може бути ще одним механізмом у його кардіопротекторній дії, яка реалізується через інгібування мітохондріальної пори.

В організмі, подібно до синтезу NO, існує три шляхи *de novo* синтезу H_2S , а також реутилізаційні. В процесі конститутивного та індукційного синтезу *de novo* H_2S утворюється з L-цистеїну за допомогою трьох ферментів: цистатіонін- γ -ліази, цистатіонін-L-синтази і 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази, які експресуються в мітохондріях тканин серцево-судинної та нервової систем. Реутилізаційний шлях синтезу H_2S здійснюється за допомогою сульфатредуктази та цистеїнліази, коли сульфат-аніон перетворюється на сульфід-аніон, а останній на сірководень, – який є регулятором мітохондріальної пори, неорганічним субстратом дихання і „хелатором” пероксинітриду в мітохондріях серця щурів, за умов фокальної ішемії–реперфузії. Встановлено достовірне збільшення його вмісту у тварин 2-ї групи порівняно з контролем. У тварин 4-ї групи його вміст був достовірно меншим, ніж у тварин 2-ї групи

Раніше встановлена інгібувальна дія фізіологічних концентрацій сірководню на відкривання мітохондріальної пори [32]. Отримані нами результати передбачають можливу активуючу дію його високих концентрацій на АФК чи АФА-залежне, а, не виключено, що і на кальційзалежне відкривання пори, яке є однією з головних причин смертності за мозкового інсульту внаслідок апоптозу клітин головного мозку, а також, як показали наші дослідження, і апоптозу кардіоміоцитів за ішемії–реперфузії, внаслідок розвитку оксидативного і нітрозативного стресів, що є неодмінними компонентами цереброваскулярного синдрому. Про це незаперечно свідчить показана нами раніше потужна антиапоптотична дія екдистерону. Крім того, зростання мітохондріальних

пулів сірководню, як було сказано вище, при аналізі можливих причин збільшення пулів нітрит-аніона, може мати адаптивне захисне значення, спрямоване на нейтралізацію високого вмісту пероксинітриду, що утворюється в незахищених екдистероном мітохондріях серця за ішемії–реперфузії внаслідок високих рівнів генерації як АФК (оксидативного стресу), так і гіпервисоких рівнів індукційного і реутилізаційного синтезу NO (нітрозативний стрес). Не виключено також, що підвищені пули сірководню в умовах комбінованого оксидативно-нітрозативного стресу використовуються мітохондріями серця як додатковий неорганічний субстрат дихання.

ВИСНОВКИ

1. За умов ішемії–реперфузії головного мозку в мітохондріях серця дорослих щурів активується конститутивний і, особливо, індукційний *de novo* синтез NO внаслідок окиснення L-аргініну, та неокисний реутилізаційний, за рахунок відновлення окиснених стабільних метаболітів NO-мітохондріальних пулів нітрат- і нітрит-аніонів, які при цьому зростають, що є доказом утворення та розпаду АФА пероксинітриду – основного маркера розвитку нітрозативного стресу. Збільшуються пули нітрозотіолів. Вищезгадане – вагомий доказ індукції нітрозативного стресу.

2. За фокальної ішемії–реперфузії головного мозку в мітохондріях серця підвищуються вміст сірководню, активність індукційної аргінази II і, як наслідок, пулу карбаміду, що є продуктом альтернативного окиснення для синтезу NO гідролізу L-аргініну аргіназою.

3. Профілактичне вживання рослинного екстаку *Serratula coronata*, збагаченого екдистероном, повністю попереджує індукцію нітрозативного стресу в мітохондріях серця щурів за умов фокальної ішемії–реперфузії головного мозку.

**Р.Р. Шарипов, А.В Коцюрба, Б.С. Копьяк,
В.Ф. Сагач**

ИНДУКЦИЯ НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА КРЫС ВО ВРЕМЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ ЭКДИСТЕРОНОМ

На модели фокальной ишемии–реперфузии головного мозга исследовали индукцию нитрозативного стресса в митохондриях сердца крыс и возможные механизмы протекторного действия экдистерона. Показано, что в этих условиях индуцируется активация конститутивного и индуцибельного *de novo* синтеза NO за счет окисления L-аргинина и неокислительного реутилизационного синтеза NO за счет восстановления окисленных стабильных метаболитов NO. Весомым доказательством индукции нитрозативного стресса был значительный рост митохондриальных пулов нитрат- и нитрит-анионов и пулов нитрозотиолов, что свидетельствует об образовании и распаде пероксинитрита – основного маркера развития нитрозативного стресса. Наблюдали также повышение содержания ключевого регулятора *de novo* синтеза NO сероводорода и активности индуцибельной аргиназы II и, как следствие, пула карбамида, который также является регулятором синтеза NO. Предварительное введение животным растительного экстракта *Serratula coronata*, обогащенного экдистероном, уменьшает индукцию нитрозативного стресса в митохондриях сердца крыс при фокальной ишемии–реперфузии.

Ключевые слова: фокальная ишемия–реперфузия головного мозга, цереброкардиальный синдром, митохондрии сердца, нитрозативный стресс, экдистерон.

**R.R. Sharipov, A.V. Kotsuruba, B.S. Kopyak,
V.F. Sagach**

INDUCTION OF NITROSATIVE STRESS IN MITOCHONDRIA OF RATS HEARTS IN EXPERIMENTAL ISCHEMIA–REPERFUSION OF THE BRAIN AND ITS CORRECTION BY ECDYSTERONE

On the model of focal ischemia–reperfusion of the brain investigated the induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts and possible mechanisms of protective action of ecdysterone. It is shown that focal ischemia–reperfusion of the brain induced in myocardial mitochondria the activation of constitutive and inducible *de novo* synthesis of NO by oxidation of L-arginine and not oxidative synthesis of NO through the recovery of oxidized stable metabolites of NO. Strong evidence of induction of nitrosative stress in heart mitochondria by focal ischemia - reperfusion of the brain, was a significant increase in mitochondrial pool of nitrat- and nitrite- anions and pools of nitrosothiols, that is proof of the

formation and decay of peroxyxynitrite - a key marker of nitrosative stress. Also was observed increase in heart mitochondria by focal ischemia–reperfusion of the brain, content key regulator of *de novo* synthesis of NO - hydrogen sulfide and activity of inducible arginase II and, as a result, the pool of carbamide, which is also a regulator of the synthesis of NO. Previous introduction for animals herbal extract *Serratula coronata*, enriched ecdysterone, reduces induction nitrosative stress in mitochondria of rats hearts under conditions of focal ischemia–reperfusion of the brain.

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

REFERENCES

1. Zozulya IS, Moshenska OP. The acute period of ischemic stroke: a modern view on the problem *Ukr Med J.* 2009; 4: 67-73 [Ukrainian].
2. Hyvrinen M, Qiao Q, Tuomilehto J. et al. The difference between acute coronary heart disease and ischaemic stroke risk with regard to gender and age in Finnish and Swedish population *Intern. J of Stroke.* 2010; 5 : 152-56
3. Johnson RH, Lambie DG, Spalding JMK. *Neurocardiology: The Interrelationships Between Dysfunction in the Nervous and Cardiovascular System.* London, England: WB Saunders; 1984: 66-70.
4. Zhdanov GN, Gerasimov MM. Studying the content of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the serum of patients with acute phase of ischemic stroke. *Cytokines and Inflamm.* 2006;5(1):27-30 [Russian].
5. di Villa Bianca R, Sorrentino R, Imbimbo C. et al. Sphingosine 1-phosphate induces endothelial nitric -oxide synthase activation through phosphorylation in human corpus cavernosum *J Pharmacol Exp.* 2006; 316(2): 703-08.
6. Kotsiuruba AV, Tuhanova AV, Bukhanevich OM, Tarakanov SS. Mechanisms of the early effect of biologically active hydroxysterols: calcitriol and ecdysterone. Identification of sphingomyelin as the effector mechanism of the early effect *Ukr Biokhim Zh.* 1995;67(2):53-8 [Ukrainian].
7. Shchokina E. G., Study of the cardioprotective features of the recombinant antagonist interleukin-1 receptors under conditions of the adrenal myocarditis in rats. *Ukr J of Biopharm.* 2012; (5-6):47-51 [Ukrainian].
8. Sharinov RR, Kotsiuruba AV, Kopyak BS, Sagach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria by focal ischemia – reperfusion brain and protective effect of ecdysterone. *Fiziol.Zh.* 2014;60(3):11-7 [Ukrainian].
9. Sojitra B, Bulani Y, Putcha UK, Kanwal A, Gupta P, et al. Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide-induced cardioprotection in mice *Mol Cell Biochem.* 2012;360: 61-69.
10. Ali MY, Ping CY, Mok YY, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Brit J Pharmacol.* 2006;149: 625-34.

11. King DL, Polhemus DJ, Bsushan SJ et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent PNAS. 2014; 111(8): 3182-87.
12. Sagach VF, Korkach YP, Kotsyuruba AV et al. Inhibition of opening mitochondrial pore by ecdysterone in the heart of old rats Fiziol. Zh. 2008;54(4):3-10 [Ukrainian].
13. Korkach JuP, Rudyk OV, Kotsuruba AV, Prsyazhna OD, Sagach VF. The nitric oxide and superoxide synthesis in protective action of ecdysterone in mitochondria of rats with streptozotocin-induced diabetes Fiziol. Zh. 2007;53(5):1-6 [Ukrainian].
14. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. ILARJ.2003;44(2):85-95.
15. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases FEBS Lett. 1991;291(1):145-49.
16. Chin SY, Pandey KN, Shi SJ. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats Am J Physiol. 1999;277(5):797-84.
17. Boyde JR, Rahmotullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime Anal. Biochem.1980; (107):424-31.
18. Alikulov ZA, Lvov NP, Kretovich VL. Nitrate and nitrite reductase activity of milk Biochemistry. 1980;45(9):1714-18 [Russian].
19. Shugalei VS, Kozina AS. Urea content and arginase activity in rat organs during acclimatization to cold Physiol. J. USSR. 1977; (8): 1199-02 [Ukrainian].
20. Green LC, Wagner DA, Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [N] nitrate in biological fluids Anal Biochem. 1982;126(1):131-38.
21. Jsukahara H. Effect of NOS inhibitions on bone metabolism in growing rats Am J. Physiol. 1996; (270)5: 840-45.
22. Gerdel D, Cederbaum AJ. Inhibition of the catalytic activity of alcoholdehydrogenase by NO is associated with S-nitrosylation and the release of zinc Biochemistry.1996;35(50):16186-194.
23. Hue Yan, Junbao Du, Chaoshu Tang. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. Biochem and Biophys Res Commun. 2004;313(1):22-27.
24. Lowery OH, Rosebroughh NI, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the Folin phenol reagent J Biol Chem. 1951; 193(1): 265-75.
25. Sagach VF, Korkach YuP, Kotsuruba AV, Prsyazhna OD. The inhibition of oxidative and nitrosative stresses by ecdysterone as the mechanisms of its cardio- and vasoprotective action at type Fiziol. Zh. 2008;54(5):1-9 [Ukrainian].
26. Rhee HJ, Kim EJ, Lee JK. Physiological polyamines:simple primordial stress molecules J Cell Mol Med. 2007;11(4):685-703.
27. Loke KE, Laycock SK. Mital S. et al. Nitric oxide modulates mitochondrial respiration in failing human heart Circulation. 1999;100(12):1291-97.
28. Reutov VP, Sorokina EG, Ohotyn VE, Kosytsyn NS. Cyclic conversion of nitric oxide in the body of mammals Science, M. 1997:158 [Russian].
29. Moibenko OO, Sagach VF, Tkachenko MM. et al. Fundamental mechanisms of action of nitric oxide on the cardiovascular system, as the basis of pathogenetic treatment of diseases Fiziol. Zh. 2004;50(1): 11-30 [Ukrainian].
30. Lee C I, Lin X, Zweier J.L. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite// J Biol Chem. 2000;275(3): 9369-76.
31. Kihara M, Schmelzer JD, Poduslo JF. et al. Aminoguanidine effects on nerve blood flow, vascular permeability, electrophysiology and oxygen free radicals Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88(14):6107-11.
32. Strutynska NA, Semenykhina OM, Shorna SV, Vavilova HL, Sagach VF. Hydrogen sulfide inhibits Ca(2+)-induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart Fiziol. Zh. 2011;57(6):3-14 [Ukrainian].

*Ин-т фізіології і. О.О. Богомольця НАН України, Київ
Egiptian77@gmail.com*

*Матеріал надійшов
до редакції 18.05.2014*