

# Порушення функціонування мітохондрій у серці при старінні супроводжується неспряженням конститутивних NO-синтаз на тлі оксидативного та нітрозативного стресу

Н.А. Струтинська, А.В. Коцюруба, А.Ю. Бudyкo, Л.А. Мись, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: na-strutynska@biph.kiev.ua

*Досліджували чутливість мітохондріальної пори (МП) до індуктора кальцію у серці дорослих і старих щурів, а також показники оксидативного та нітрозативного стресу в мітохондріях та тканинах серця. На основі експериментально визначених показників розрахували індекс спряження конститутивних NO-синтаз (cNOS). Показано, що при старінні розвивається оксидативний і нітрозативний стрес, що супроводжується зниженням індексу спряження cNOS і підвищенням чутливості МП до індуктора кальцію. Встановлено, що у мітохондріях серця старих щурів суттєво зростали такі показники оксидативного стресу – швидкість генерації супероксидного ( $\text{O}_2^-$ ) у 4 рази і гідроксильного ( $\text{OH}$ ) аніон-радикалів у 2,7 рази та вміст сечовини і ранніх продуктів перекисного окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів – на порядок, що вказує на інтенсифікацію цих процесів. При цьому спостерігали підвищення показників нітрозативного стресу, а саме активності iNOS та нітратредуктази. Водночас за старіння в органелах знижувалися пули  $\text{NO}_2^-$ , що утворюються за нормальної оксигенації органа, а також низькомолекулярних нітрозотолів і активність  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулінзалежних cNOS. Останнє зумовлено зростанням неспряженого стану cNOS, внаслідок чого посилюється окисний стрес. Також в органелах суттєво знижувався ендогенний вміст газового медіатора сірководню ( $\text{H}_2\text{S}$ ). На тлі цих процесів спостерігали підвищення чутливості МП до кальцію у серці старих тварин, спричинене зниженням у мітохондріях концентрації оксиду азоту і сірководню, котрі мають інгібіторний вплив на МП, і водночас, підвищенням рівня активних форм кисню та азоту (АФК, АФА), які є індукторами її відкриття.*

*Ключові слова: мітохондрії; серце; неспряження cNOS; оксидативний стрес; старіння; щури.*

## ВСТУП

Старіння організму – складний фізіологічний процес, що характеризується послабленням функцій всіх органів, зокрема, серця, та підвищенням їх чутливості до дії стресових факторів [1]. Дисбаланс між продукцією вільних радикалів – АФК та АФА – й антиоксидантними системами захисту в клітині призводить до оксидативного та нітрозативного стресу, що супроводжує фізіологічне старіння та є причиною розвитку таких патологічних станів, як ішемія, гіпоксія, діабет тощо [2, 3]. Вважається, що мітохондрії з віком стають основним джерелом супероксидного ради-

© Н.А.Струтинська, А.В. Коцюруба, А.Ю. Бudyкo, Л.А. Мись, В.Ф. Сагач

кала ( $\text{O}_2^-$ ), який самостійно чи взаємодіючи з оксидом азоту (NO) утворює токсичні гідроксильний аніон-радикал ( $\text{OH}$ ) і пероксинітрит ( $\text{ONOO}^-$ ) [4]. Оксид азоту, який синтезується індукцибельною  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежною NO-синтазою (iNOS), продукується у великих кількостях за патологічних умов, знижуючи при цьому рівень субстрату L-аргініну для конститутивних  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулінзалежних NOS (cNOS) – ендотеліальної (eNOS) та нейрональної (nNOS). До механізмів виникнення оксидативного стресу також відносять неспряження cNOS, яке зумовлене втра-тою здатності ферментами перетворювати

L-аргінін у L-цитрулін з вивільненням NO, натомість відбувається перенесення електронів від НАДФН на молекулярний кисень, з утворенням супероксидного радикала [5]. Як відомо, NOS для своєї роботи потребують НАДФН, ФМН, ФАД, кальмодулін, гем та кофактор тетрагідробіоптерин, а їхнє неспряження може відбуватися внаслідок дефіциту кофактора, виснаження субстрату L-аргінину, накопичення ендogenousного інгібітора NOS – асиметричного диметиларгінину (ADMA) та S-глутатіонілювання eNOS [6].

Встановлено, що знижена біодоступність NO в результаті неспряження NOS відіграє важливу роль у такій патології серця, як дилатаційна кардіоміопатія, ішемічно-реперфузійне пошкодження, ендотеліальна дисфункція, атеросклероз, гіпертензія, цукровий діабет [5, 7]. Усі ці порушення характеризуються дисфункцією мітохондрій, одним із проявів якої є відкриття неселективної циклоспоринчутливої мітохондріальної пори (МП), індукторами якої є оксидативний стрес і навантаження  $Ca^{2+}$  [8]. Відомо, що відкриття високопровідної МП між зовнішньою і внутрішньою мембранами органел викликає колапс мітохондріального потенціалу, що призводить до втрати енергоутворювальної функції органел (синтезу АТФ) і індукції клітинної смерті – апоптозу [8, 9]. Тим не менше існує МП, яка характеризується низькою провідністю і оборотністю, відіграє фізіологічну роль, вивільняючи кальцій і АФК з органел, тим самим регулюючи кальцієвий і енергетичний гомеостаз клітини. Молекулярна ідентичність компонентів МП наразі залишається до кінця не з'ясованою. Останні дані свідчать про участь фосфатного транспортера та с-субодиниці АТФази мітохондрій у пороутворенні [10]. Порушення функціонування серця при старінні може бути пов'язано з мітохондріальною дисфункцією, а саме з відкриттям високопровідної МП.

На сьогодні не існує достатньо відомостей щодо неспряження NOS у серці при

старінні, проте підвищений вміст АФК та АФА свідчить про те, що ферменти синтезу оксиду азоту за цих умов можуть працювати не ефективно, продукуючи  $\cdot O_2^-$ . Тому мета нашої роботи – дослідження різних джерел утворення  $\cdot O_2^-$  і NO, їх ролі у розвитку оксидативного і нітрозативного стресу, а також впливу останніх на чутливість МП до кальцію при старінні.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (6 міс, 220-250 г) і старих (24 міс, 300-350 г) щурах лінії Вістар. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. При дослідженні враховано міжнародні принципи Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986). У кожній серії дослідів використано не менше ніж 10-12 тварин.

У свіжоприготовлених гомогенатах серця щурів та мітохондріях серця визначали біохімічні показники оксидативного стресу (швидкість генерації супероксидного ( $\cdot O_2^-$ ) і гідроксильного ( $\cdot OH$ ) радикалів, пули стабільного пероксиду водню ( $H_2O_2$ ), ейкозаноїдів - тромбоксану  $B_2$  ( $TxB_2$ ) та пептидолейкотрієну  $C_4$  ( $LTC_4$ ), сечової кислоти й дієнових кон'югатів (ДК) [11]. Визначали показники нітрозативного стресу: кальційзалежну активність cNOS, як суму eNOS і nNOS, кальційнезалежну активність iNOS, активність нітратредуктази, пули стабільних метаболітів NO – нітрит ( $NO_2^-$ ) - і нітрат ( $NO_3^-$ ) -аніонів, низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ), вміст ендogenousного сірководню ( $H_2S$ ) [12]. Індекс спряження cNOS розраховували як відношення активності cNOS до різниці швидкості генерації  $\cdot O_2^-$  без та за наявності її інгібітора L-NAME [7].

Відкриття МП досліджували за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів [13]. Для цього мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного

складу (ммоль/л): КСl – 120, тріс-НСl – 25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реестрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при  $\lambda=520$  нм за 5 хв до і впродовж 15 хв їх набухання за наявності індуктора  $\text{Ca}^{2+}$  у концентрації  $10^{-4}$  моль/л. Зміну рівня набухання органел визначали як різницю у відсотках ( $\Delta, \%$ ) між показником набухання мітохондрій на 15-й хвилині відносно вихідного значення. Концентрація білка, яку визначали за методом Лоурі, в інкубаційному середовищі становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора з подальшою реестрацією оптичної густини протягом 15 хв. Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excell (MS Office XP), Student (MS Excell) та Origin 6.0 («Microcall Inc.», США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для з'ясування біохімічних механізмів, що призводять до мітохондріальних дисфункцій у серці при старінні, ми визначили показники, які характеризують наявність комбінованого окисного стресу та надлишкового синтезу  $\cdot\text{O}_2^-$

і NO. Як видно з рис. 1, більшість показників окисативного стресу як у мітохондріях, так і тканинах серця в цілому при старінні були вищими від контрольних значень або мали тенденцію до зростання, що свідчить про посилення вільнорадикальних процесів. Так, швидкості генерації нестабільних активних форм кисню, а саме  $\cdot\text{O}_2^-$ , як результат функціонування ксантиноксидази, НАДФН-оксидази чи дихального ланцюга мітохондрій, а також  $\cdot\text{OH}$  зростали при старінні у 4 і 2,7 раза відповідно у мітохондріях серця, а також у його тканинах (в 3,7 і 4 рази відповідно). Підвищувався також вміст стабільного  $\text{H}_2\text{O}_2$ , порівняно з контролем. Вірогідно не відрізнялися від контрольних значень пули тромбоксану  $\text{B}_2$ , які характеризують активність циклооксигеназного метаболічного шляху продукції  $\cdot\text{O}_2^-$  та пули ейкозаноїдів пептидолейкотрієну  $\text{C}_4$ , як маркера утворення  $\cdot\text{O}_2^-$  ліпоксигеназою із залученням потужного антиоксиданта глутатіону. Пули сечової кислоти, як кінцевого продукту обміну пуринів, які характеризують активність ксантиноксидази (див. рис. 1, а) у мітохондріях зростали на порядок, а в тканинах серця – в 2,5 раза (див. рис. 1, б), що засвідчує інтенсифікацію вільнорадикальних процесів в органі.

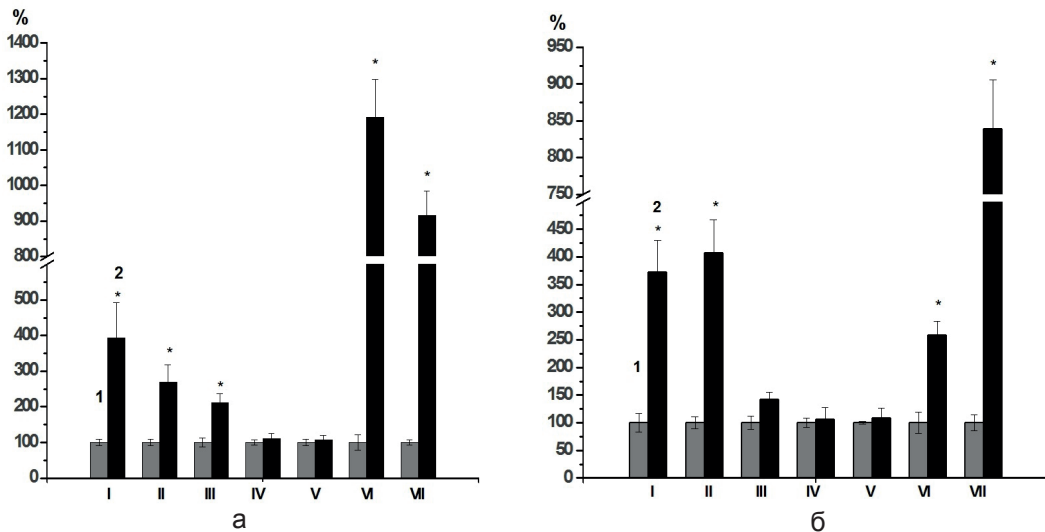


Рис. 1. Відносні показники окисативного стресу в мітохондріях (а) та тканинах серця (б) дорослих (1) та старих щурів (2): I – швидкість генерації  $\cdot\text{O}_2^-$ ; II – швидкість генерації  $\cdot\text{OH}$ ; III – вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; IV – вміст тромбоксану  $\text{B}_2$ ; V – вміст пептидолейкотрієну  $\text{C}_4$ ; VI – вміст сечової кислоти, VII – вміст дієнових кон'югатів. \* $P < 0,05$  відносно контролю

Суттєве зростання пулів ранніх продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – ДК, що є маркерами інтенсивності окисного стресу, також вказує на розвиток цього процесу мітохондріях і тканинах серця зокрема при старінні.

Як видно з рис. 2, у мітохондріях і тканинах серця при старінні розвивається не лише окисдаивний, як було показано вище, а також і нітрозативний стрес. Так, показано зростання активності iNOS (кальційнезалежний *de novo* синтез NO) та нітратредуктази. Натомість знижувалась активність cNOS, яку ідентифіковано як мітохондріальну NOS (mtNOS) чи nNOS (кальційзалежний *de novo* синтез NO), пули  $\text{NO}_2^-$  і низькомолекулярних нітрозотіолів (див. рис. 2, а). Зростання вмісту нітратредуктази – НАДН-залежного ензиму, що відновлює нітрати до нітритів, може свідчити про компенсаторне підвищення реутилізаційного синтезу NO. Відомо, що NO трансформується в такі стабільні метаболіти, як нітрит- та нітрат-аніони [14]. Вміст цих метаболітів відображає стан окисного обміну аргініну в кардіоміоцитах. Спонтанним продуктом окиснення NO за фізіологічних умов при нормальній оксигенації (нормоксії)

є  $\text{NO}_2^-$ . Встановлено, що в мітохондріях серця старих щурів пули  $\text{NO}_2^-$ , що є маркером доступності кисню для спонтанного неферментативного окиснення NO, знижуються втричі. При цьому пули  $\text{NO}_3^-$ , що є маркером утворення і розпаду пероксинітриту, не змінювалися. Це свідчить про підвищення в умовах окисного стресу утилізації NO, що посилено синтезувався ферментом iNOS, не на спонтанне окиснення молекулами кисню до аніонів нітриту, а на утворення пероксинітриту і його вільнорадикальний розпад, на що вказує відсутність вірогідного підвищення мітохондріальних пулів аніонів нітрату. Пули НМНТ знижувалися в мітохондріях вдвічі. Цей комплекс включає три компоненти: нітрозильовану амінокислоту L-цистеїн, що є попередником *de novo* синтезу  $\text{H}_2\text{S}$ , нітрозоглутатіон (GSNO), що містить у своєму складі L-цистеїн і нітрозильований сірководень (HSNO). НМНТ беруть участь у транспортуванні і депонуванні NO з його вивільненням в процесі декомпозиції, а зниження їх пулів характеризує зменшення інтенсивності цих процесів. В тканинах серця (див. рис. 2, б) старих щурів також спостерігали подібні зміни: підвищення активності

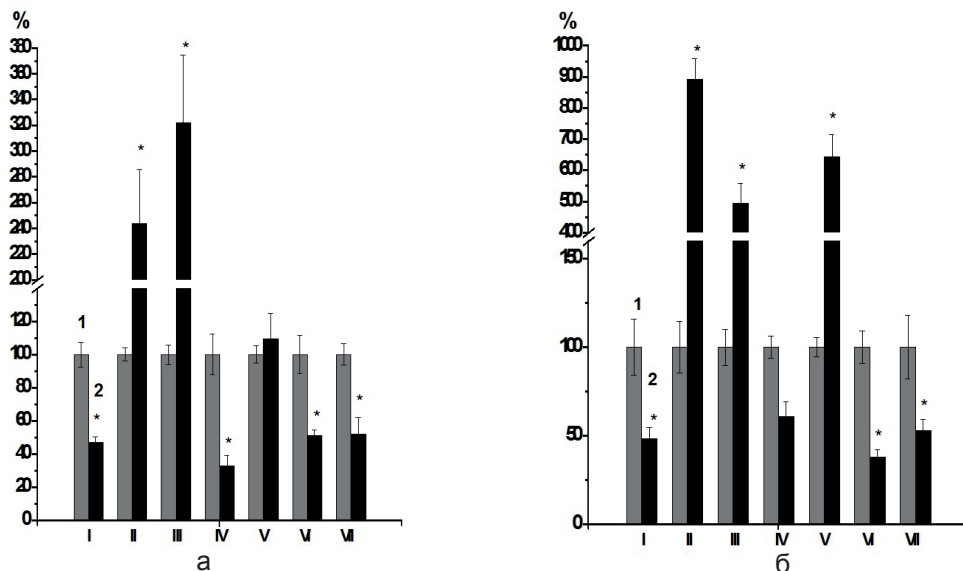


Рис. 2. Відносні показники нітрозативного стресу в мітохондріях (а) та тканинах серця (б) дорослих (1) та старих щурів (2): I – активність конститутивних NO-синтаз, II – активність індукцибельної NO-синтази, III – нітратредуктазна активність, IV – вміст  $\text{NO}_2^-$ , V – вміст  $\text{NO}_3^-$ , VI – вміст низькомолекулярних нітрозотіолів, VII – вміст  $\text{H}_2\text{S}$ , \* $P < 0,05$  відносно контролю

iNOS, нітратредуктази, пулів  $\text{NO}_3^-$ , а також зниження активності cNOS (eNOS і nNOS), пулів  $\text{NO}_2^-$  та НМНТ. Відмінність полягала у суттєвому зростанні в серці пулів нітрат-аніона, що утворюється при розпаді пероксинітриду, і є його маркером. Значне підвищення при старінні активності неокисного ферменту – нітратредуктази, як і активності ферменту *de novo* синтезу оксиду азоту iNOS, може бути доказом регуляторної ролі не лише АФК, але і АФА в мітохондріях і серці.

Також в органелах і тканинах серця старих тварин вдвічі знижувалися пули сірководню – важливого газового трансмітера в серцево-судинній системі і регулятора активності cNOS. Це може свідчити про порушення ендogenous синтезу цього медіатора  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезувальними ферментами – цистатіонін- $\gamma$ -ліазою в цитозолі карціоміоцитів та 3-меркаптопіруватсульфотрансферазою в мітохондріях серця.

Внаслідок таких змін у мітохондріях і тканинах серця в умовах старіння суттєво ( $P < 0,01$ ) знижувалися значення індексів спряження cNOS (рис. 3). Цей індекс характеризує наявність субстратів (L-аргінін,  $\text{O}_2$ ) і кофактора тетрагідробіоптерину для утворення NO, а не  $\text{O}_2^-$  при окисному метаболізмі L-аргініну. Вважається [15], що будь-яке

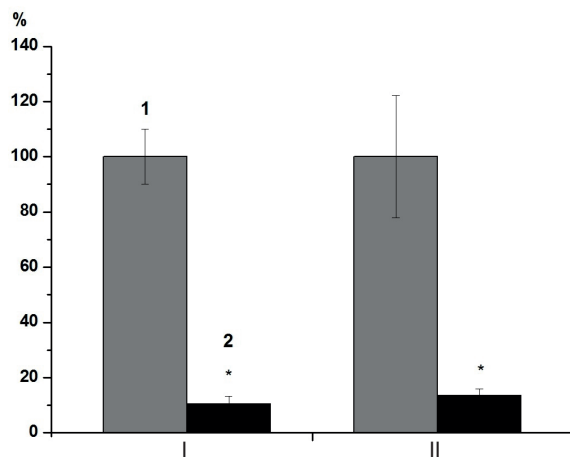


Рис. 3. Відносні значення індексів спряження конститутивних NO-синтаз у мітохондріях серця (I) та тканині серця (II) дорослих (контрольних) (1) та старих шурів (2). \* $P < 0,05$  відносно контролю

підвищення генерації  $\text{O}_2^-$  (мітохондріями, ксантинооксидазою чи НАДФН-оксидазою) спричиняє неспряження eNOS. Внаслідок цього ізоферменти конститутивного *de novo* синтезу NO (eNOS і nNOS) продукують  $\text{O}_2^-$  замість NO, тим самим утворюючи замкнене коло взаємопідсилення окисного стресу і неспряження cNOS. Отже, старіння характеризується неспряженим станом cNOS на тлі окисного і нітрозативного стресу. Таке неспряження cNOS було показано при гіпертензії, що супроводжувалося порушення кардіогемодинаміки [7].

У наших досліджах *in vitro* на ізольованих мітохондріях реєстрували відкриття МП у серці шурів, використовуючи природний її індуктор  $\text{Ca}^{2+}$  у концентрації  $10^{-4}$  моль/л (рис. 4, а). Показано посилення рівня спонтанного набухання мітохондрій (контроль у безкальцієвому середовищі) та кальційіндукованого набухання органел, що відбувалося внаслідок відкриття МП у серці старих шурів порівняно з контрольними. Раніше було встановлено, що відкриття МП у серці дорослих шурів повністю пригнічувалося специфічним її інгібітором циклоспорином А, а у старих тварин – лише частково. Це свідчило про те, що в мітохондріях серця старих шурів поряд з утворенням класичної МП, формується неспецифічна циклоспорин А-нечутлива пара [16]. В експериментах *in vivo* спостерігали підвищення чутливості МП до кальцію, внаслідок зменшення на два порядки порогової концентрації індуктора, яка спричиняла набухання органел (див. рис. 4, б). Зміну чутливості МП до індуктора  $\text{Ca}^{2+}$  визначали за різницею величин набухання мітохондрій при дії індуктора в діапазоні концентрацій  $10^{-7}$  –  $10^{-4}$  моль/л у серці дорослих і старих шурів. Поріг чутливості відповідав найменшій концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , яка викликала набухання мітохондрій у серці. Варто зазначити, що зниження порогу дії кальцію, що індукує відкриття МП, корелювало зі зниженням значень біохімічних індексів спряження cNOS у мітохондріях і тканинах серця.



Безперечно, що такі порушення у функціонуванні мітохондрій мають призводити до погіршення функціональних показників діяльності серця за старіння. Так, було виявлено діастолічну дисфункцію лівого шлуночка та порушення релаксації серця у старих щурів. Водночас суттєво зростало споживання кисню та збільшувалась ударна робота серця, що вказувало на менш ефективну діяльність серця [17].

Отже, у мітохондріях серця старих щурів суттєво зростали такі показники оксидативного стресу, як швидкість генерації  $\cdot\text{O}_2^-$  і  $\cdot\text{OH}$ , а також вміст сечовини, що характеризує активність ксантинооксидази, і ранній продукт ПОЛ – ДК. При цьому максимально підвищувалися такі показники нітрозативного стресу, а саме: активність iNOS, яка активується прозапальними цитокінами ( $\cdot\text{O}_2^-$  підсилює цю індукцію), активність нітратредуктази, в основному нітрат- і нітритредуктазної активності ксантинооксидази, яка активується за гіпоксії. Водночас пули  $\text{NO}_2^-$  в органелах в умовах старіння, що утворюється за нормальної оксигенації органа, НМНТ і, головне, активність sNOS знижувались. Останнє, очевидно, зумовлено зростанням її неспряженого стану, внаслідок чого посилюється окисний стрес і спричиняє більший рівень неспряженості. Та-

кож в органелах знижувалися пули газового медіатора сірководню – важливої сигнальної молекули в серцево-судинній системі. На тлі цих процесів спостерігали підвищення на два порядки чутливості МП до кальцію у серці, що може бути важливим показником пригнічення функціонального стану органа з віком.

Нині відомо, що відкривання МП в стані високої провідності модулюється різними чинниками ендogenous та екзогенного походження. Деякі з цих модуляторів, активуючи чи інгібуючи пороутворення, можуть відігравати важливу роль у формуванні та регулюванні МП. Так, окисний стрес, високий вміст матричного  $\text{Ca}^{2+}$  та неорганічного фосфату [ $\text{P}_i$ ], зростання рН тощо сприяють відкриванню цього комплексу, в той час як аденінові нуклеотиди (АТФ і АДФ), циклоспорин А і сангліферин А запобігають цьому процесу [9]. Відомо також, що пороутворення може відбуватися без збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в органелах, якщо один з індукторів змінюється відповідним чином. Наприклад, під час реперфузії ішемізованого серця, за якого спостерігається окисний стрес, виснаження аденінових нуклеотидів і підвищення концентрації фосфатів та рівнів рН. На різних експериментальних моделях було показано, що такі інгібітори відкривання МП, як цикло-

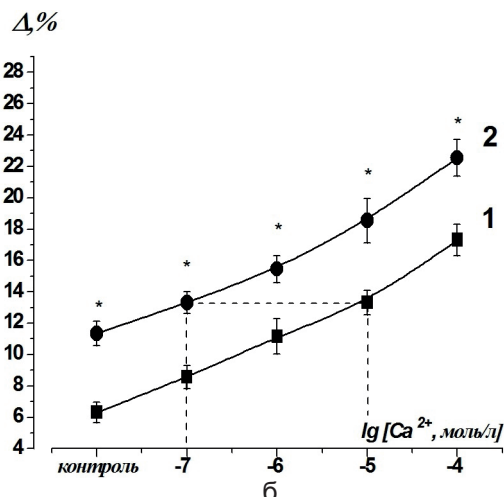
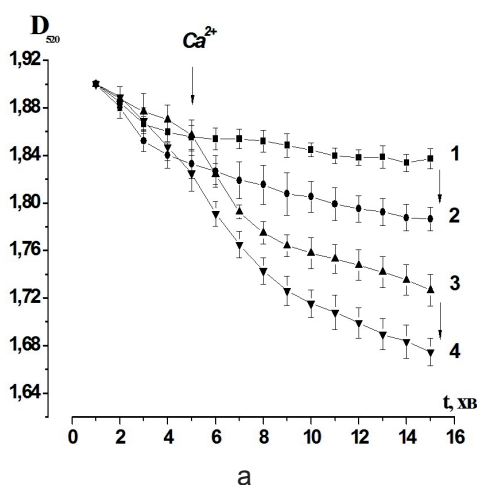


Рис.4. Відкривання мітохондріальної пори у серці: а – набухання мітохондрій серця у безкальцієвому середовищі (1, 2) та за дії  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л) (3, 4) у дорослих (1, 3) і старих (2, 4) щурів; б – зміна чутливості мітохондріальної пори до індуктора кальцію у серці дорослих (1) і старих (2) щурів, \* $P < 0,05$  порівняно з контролем дорослих щурів

спорин А і сангліферин, забезпечують захист від реперфузійних пошкоджень і зменшують тим самим розмір інфаркту міокарда. Зміна мітохондріального потенціалу може також регулювати відкритий стан МП, незалежно від поглинання органелами  $\text{Ca}^{2+}$  [9].

Досліджуючи механізми формування і регуляції пороутворення у серці за старіння, нами було показано зростання експресії генів двох основних структурних компонентів МП – потенціалзалежного аніонного каналу і транспортера аденінових нуклеотидів [18], що сприяло утворенню більшої кількості цих мегаканалів. Також було встановлено, що екзогенне введення газових медіаторів – NO і  $\text{H}_2\text{S}$ , пригнічує кальційіндуковане відкривання МП, що свідчить про їх протекторний вплив на пороутворення у серці [13, 19]. Тому недостатнє їх ендогенне вироблення при старінні, як ми показали у цій роботі, може бути одним з можливих факторів, що призводить до підвищення чутливості МП до кальцію і вказувати на NO- і  $\text{H}_2\text{S}$ -залежні механізми регуляції пороутворення у серці.

Розуміння механізмів виникнення мітохондріальних дисфункцій дасть змогу попередити чи усунути їх розвиток. Так, можна зробити висновок, що мітохондріальна дисфункція, яка спостерігається за старіння, реалізується через неспряження cNOS на тлі зростання вмісту АФК та АФА, порушення кальцієвого гомеостазу, зниження рівня ендогенного синтезу сірководню, що призводить до індукції високопровідної МП внаслідок зростання її чутливості до кальцію. Тому для усунення мітохондріальної дисфункції за старіння, на нашу думку, необхідним є відновлення спряженого стану cNOS з одночасним максимальним послабленням окисидативно-нітрозативного стресу і підвищенням активності cNOS та відновлення пулів сірководню, що дасть змогу знизити чутливість МП до індуктора у серці при старінні і, можливо, попередити розвиток патологічних станів організму в цілому.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що у мітохондріях серця старих щурів розвивався оксидативний стрес, що проявлявся у суттєвому зростанні швидкості генерації супероксидного і гідроксильного аніон-радикалів у 4 рази та 2,7 рази відповідно. Також майже на порядок зростав вміст сечовини і ранніх продуктів ПОЛ – ДК, що характеризує інтенсифікацію вільнорадикальних процесів.

2. У мітохондріях серця старих щурів спостерігали зміну значень показників, що характеризують розвиток нітрозативного стресу, а саме зростання активності iNOS та нітратредуктази в 2,2 і 3,2 рази відповідно. Водночас за старіння в органелах знижувалися пули  $\text{NO}_2^-$ , що утворюються за нормальної оксигенації органа, низькомолекулярних нітрозотіолів і активність cNOS.

3. Показано суттєве зменшення індексів спряження cNOS в мітохондріях і тканинах серця, що свідчить про функціонування цього ферменту у неспряженому стані на тлі оксидативного стресу, за якого додатково генерується  $\text{O}_2^-$  і посилюється цей процес.

4. Встановлено зниження ендогенного синтезу газового медіатора сірководню у мітохондріях і тканинах серця старих тварин.

5. Підвищений вміст АФК та АФА, а також неспряження cNOS і зниження пулів ендогенного сірководню призводять до підвищення чутливості МП до кальцію, що характеризує дисфункцію мітохондрій при старінні.

N.A. Strutynska, A.V. Kotsiuruba, A.Yu. Budko,  
L.A. Mys, V.F. Sagach

## MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN THE AGING HEART IS ACCOMPANIED BY CONSTITUTIVE NO-SYNTASES UNCOUPLING ON THE BACKGROUND OF OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS

We investigated the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening to its inductor calcium, as well as indicators of oxidative and nitrosative stress in adult and old rat heart mitochondria and heart tissues. The coupling index of constitutive  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent NO-synthase (cNOS)

was calculated based on experimentally found parameters. The aging is characterized by oxidative and nitrosative stress, which accompanied by a decrease of the cNOS coupling index and an increased sensitivity of MPTP to calcium. We found that in the heart mitochondria of old rats such oxidative stress indicators as the rate of generation of superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) and hydroxyl ( $\text{OH}$ ) anion radicals were significantly increased (in 4 and 2,7 times respectively). Also, increased levels of urea and products of early lipid peroxidation – conjugated dienes display the intensification of oxidative stress. Such indicators of nitrosative stress as nitrate reductase and iNOS activity were also enhanced. At the same time under aging the  $\text{NO}_2^-$  pools, generated when the heart oxygenation is normal, nitrosothiols pools and the activity of cNOS were decreased. It is due to the enhanced level of cNOS uncoupling, resulting in increased oxidative stress. It was also shown the lower level of hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ) in old rat heart mitochondria. Thus, we observed the increased sensitivity of MPTP to calcium, due to decreased concentration of its inhibitors nitric oxide and hydrogen sulfide and increased levels of its inducers ROS and RNS in old rat heart mitochondria.

Keywords: mitochondria; heart; cNOS uncoupling; oxidative stress; aging rats.

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

**Н.А. Струтинская, А.В. Коцюруба,  
А.Ю. Бudyко, Л.А. Мысь, В.Ф. Сагач**

## **НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ В СЕРДЦЕ ПРИ СТАРЕНИИ СОПРОВОЖДАЕТСЯ НЕСОПРЯЖЕНИЕМ КОНСТИТУТИВНЫХ NO-СИНТАЗ НА ФОНЕ ОКСИДАТИВНОГО И НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССОВ**

Исследовали чувствительность митохондриальной поры (МП) к индуктору ее открытия кальцию в сердце взрослых и старых крыс, а также показатели оксидативного и нитрозативного стресса в митохондриях и тканях сердца. На основе экспериментально определенных показателей рассчитали индекс сопряжения конститутивных  $\text{Ca}^{2+}$ / кальмодулин-зависимых NO-синтаз (cNOS). Показано, что при старении развивается оксидативный и нитрозативный стресс, сопровождающийся снижением индекса сопряжения cNOS и повышением чувствительности митохондриальной поры (МП) к  $\text{Ca}^{2+}$ . Установлено, что в митохондриях сердца старых крыс существенно увеличивались такие показатели оксидативного стресса как скорость генерации супероксидного ( $\text{O}_2^-$ ) и гидроксильного ( $\text{OH}$ ) анион-радикалов в 4 и 2,7 раза соответственно, а также содержание мочевины и ранних продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов – на порядок, что указывает на интенсификацию этих процессов. При этом наблюдалось повышение показателей нитрозативного

стресса, а именно активности iNOS и нитратредуктазы. В то же время при старении в митохондриях снижались пулы  $\text{NO}_2^-$ , образующиеся при оксигенации сердца, а также пулы низкомолекулярных нитрозотиолов и активность конститутивных NOS. Последнее обусловлено ростом несопряженного состояния cNOS, вследствие чего усиливается окислительный стресс. Также в органеллах существенно снижался уровень эндогенного регулятора сероводорода ( $\text{H}_2\text{S}$ ). На фоне этих процессов наблюдалось повышение чувствительности МП к кальцию в сердце старых животных, что обусловлено снижением в митохондриях концентрации оксида азота и сероводорода, которые имеют ингибиторное влияние на МП и в то же время, повышением уровня АФК и АФА, которые являются индукторами ее открывания.

Ключевые слова: митохондрии; сердце; несопряжение cNOS; оксидативный стресс; старение; крысы.

## **REFERENCES**

1. Lakatta EG. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *J Mol and Cell Cardiol.* 2015; 83:1–13.
2. Zhang Yu, Tang Zh-H, Ren Zh, Qu Sh-L, Liu M-H, Liu L-Sh, Jiang Z-S. Hydrogen Sulfide, the Next Potent Preventive and Therapeutic Agent in Aging and Age-Associated Diseases. *Mol Cell Biol.* 2013; 33(6):1104–13.
3. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956; 11:298–300.
4. Lee HC, Wei YH. Mitochondria and aging. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 942:311–27.
5. Roe ND, Ren J. Nitric oxide synthase uncoupling: A therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vasc Pharm.* 2012; 57:168–72.
6. Li H, Forstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin in Pharm.* 2013; 13:1–7.
7. Kotsuruba AV, Dorofeyeva NA, Sagach VF. NOS Uncoupling is accompanied with Induction of the Oxidative Stress and the Cardiohemodynamics Disturbances in Hypertension. *Fiziol Zh.* 2015; 61(3):3–10 [Ukrainian].
8. Javadov S, Karmazyn M, Escobales N. Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as a Promising Therapeutic Target in Cardiac Diseases. *J Pharmacol and Exp Therap.* 2009; 330(3):670–8.
9. Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol and Cell Cardiol.* 2015; 78:129–141.
10. Ong S-B, Samangouei P, Beikoghli SK, Hausenloy DJ. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol and Cell Cardiol.* 2015; 78:23–34.
11. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia-reperfusion of the brain



- and its correction by ecdysterone. Fiziol Zh. 2014; 60(5):3-13 [Ukrainian].
12. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop'iak BS, Sahach VF. Induction of oxidative stress in heart mitochondria in brain focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. Fiziol Zh. 2014; 60(3):11-7 [Ukrainian].
  13. Strutynska NA, Semenykhina OM, Chorna SV, Vavilova GL, Sagach VF. Hydrogen sulfide Inhibits Ca<sup>2+</sup>-induced Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening in Adult and Old Rat Heart. Fiziol Zh. 2011; 57(6):3-13 [Ukrainian].
  14. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. Amer J Kidney Diseases. 1994; 24:112–129.
  15. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. Cardiovasc Res. 2006; 71(2):247-58.
  16. Sagach VF, Vavilova GL, Strutyns'ka NA, Rudyk OV. The aging increase in the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening to inducers in rat heart. Fiziol Zh. 2004; 50(2): 49-63 [Ukrainian].
  17. Dorofeyeva NA, Drachuk KO, Sagach VF. Cardiohemodynamics and Efficiency of Frank-Starling Mechanism during Aging. Fiziol Zh. 2015; 60(6):22-26. [Ukrainian].
  18. Chorna SV, Dosenko VE, Strutynska NA, Vavilova GL, Sagach VF. Increased Expression of Voltage-dependent Anion Channel and Adenine Nucleotide Translocase and the Sensitivity of Ca<sup>2+</sup>-induced Mitochondrial Permeability Transition Opening Pore in Old Rat Heart. Fiziol Zh. 2010; 56(4):19–25 [Ukrainian].
  19. Akopova OV, Kotsiuruba AV, Tkachenko YuP, Sagach VF. Nitric Oxide Suppresses Permeability Transition Pore Opening and Enhances Calcium Uptake in Mitochondria in vivo. Fiziol Zh. 2005; 51(3):3–11 [Ukrainian].

*Матеріал надійшов  
до редакції 25.12.2015*