

Можливе значення аденілатциклазного сигнального шляху в синтезі оксиду азоту мітохондріями міометрія

Ю.В. Данилович, Г.В. Данилович, С.О. Костерін

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ; e-mail: danylovychy@biochem.kiev.ua

Досліджено NO-синтазну активність (mtNOS) у мітохондріях гладенького м'яза матки за дії модуляторів сигнальної системи циклічний аденозинмонофосфат (цАМФ)/протеїнкіназа А. Експерименти проведено на ізольованих мітохондріях з міометрія щурів із використанням NO-чутливого флуоресцентного зонда DAF-FM-DA. Синтез NO в мітохондріях підвищувався за дії активаторів аденілатциклази 30 ммоль/л NaHCO_3 та 10 мкмоль/л форсколіну, а також інгібітора фосфодіестераз 1 ммоль/л кофеїну. Додавання АТФ (0,5–5 ммоль/л) призводило до незначного зростання синтезу оксиду азоту. За наявності NaHCO_3 та кофеїну ефект АТФ посилювався. У разі пригнічення активності аденілатциклази сполукою КН7 (25 мкмоль/л) інтенсивність утворення NO в мітохондріях зменшувалася приблизно на 50 %. За наявності інгібітора протеїнкінази А PKI (10 нмоль/л) синтез NO в мітохондріях також суттєво зменшувався. При внесенні до середовища інкубації інгібітора конститутивних NO-синтаз L-NAME (100 мкмоль/л) стимулюючого впливу досліджуваних сполук на синтез NO у мітохондріях не спостерігалось. Ці результати вказують на можливу залежність функціонування mtNOS від активності сигнальної системи цАМФ/протеїнкіназа А в мітохондріях гладеньких м'язів.

Ключові слова: оксид азоту; мітохондрії; мітохондріальна NO-синтаза; циклічний аденозин-монофосфат; протеїнкіназа А; гладенькі м'язи.

ВСТУП

Наявність у мітохондріях конститутивної ізоформи NO-синтази (mtNOS) була доведена імуногістохімічними методами для окремих тканин: печінки, серця [1, 2], мозку [3], нирок [4], скелетного м'яза (діафрагми) [5] та тимуса [6]. mtNOS зумовлює можливість ендогенного біосинтезу оксиду азоту енергізованими мітохондріями в кисневмісному середовищі. За деякими властивостями вона відповідає нейрональній ізоформі NO-синтази і, можливо, є її сплайс-варіантом [7], а наявність PDZ-домену забезпечує взаємодію цього ензиму і комплексу I або/і IV дихального ланцюга [8–12]. Ендогенне утворення NO мітохондріями залежить від їхнього метаболічного стану, електричного потенціалу на внутрішній мітохондріальній мембрані

і є Ca^{2+} -залежним процесом. Вірогідно, оксид азоту забезпечує тонкі регуляторні реципрокні взаємодії активності mtNOS та внутрішньомітохондріальних Ca^{2+} , pH, L-аргініну, O_2 та редокс-стану мітохондрій [2, 8]. Раніше нами була ідентифікована mtNOS у гладенькому м'язі матки і досліджені її окремі біохімічні властивості [13].

Однією з можливих модифікацій активності mtNOS може бути фосфорилування за участю протеїнових кіназ, зокрема протеїнкінази А. Брауном зі співавт. [14] в 1975 р. була продемонстрована активність розчинної аденілатциклази в клітинах репродуктивних тканин самців. Ця ізоформа виявилася відмінною від уже відомої, яка зв'язана з плазматичною мембраною, аденілатциклази і активувалася Mn^{2+} . Було встановлено, що розчинна ізоформа безпосередньо стиму-

© Ю.В. Данилович, Г.В. Данилович, С.О. Костерін

лювалася бікарбонатом та іонами Ca [15]. Пізніше описали аденілатциклазну активність у різних клітинних компартментах, в тому числі мітохондріях, ядрі, центріолях [16]. Наявність елементів аденілатциклазного сигнального каскаду, зокрема ізоформ розчинної аденілатциклази, у мітохондріях доведена для низки об'єктів. Демонструється генерація циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) у матриксі мітохондрій, де він, як передбачають, забезпечує спряження між утворенням CO₂ у циклі трикарбонових кислот та активністю процесу окисного фосфорилування [17]. Його розщеплення в мітохондріях з утворенням неактивного 5'-АМФ забезпечується фосфодіестеразою 2А [17]. Можливість регуляції синтезу NO в цих субклітинних структурах з боку аденілатциклази та протеїнкінази А не вивчалася.

Метою нашої роботи було дослідити залежність синтезу оксиду азоту від сигнального шляху цАМФ/протеїнкінази А в ізольованих мітохондріях міометрія.

МЕТОДИКА

У досліджах використовували статевозрілих невагітних нелінійних щурів віком 2 міс, з середньою масою тіла 200 г, масою матки 350–600 мг. Тварин вводили в стан наркозу витримуванням у камері, збагаченій парами хлороформу, після чого декапітували. Всі маніпуляції з тваринами були проведені відповідно до Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових цілей (Страсбург, 1986).

У роботі застосували панель загально-вживаних інгібіторів та активаторів аденілатциклази та протеїнкінази А: відомий активатор аденілатциклази форсколін, NaHCO₃, її селективний інгібітор КН7, а також специфічний інгібітор протеїнкінази А (РКІ), який є поліпептидом клітинного походження [17–20].

Препарат ізольованих мітохондрій одержували з міометрія щурів за допомогою стандартного підходу із застосуванням диференційного центрифугування [21]. Вміст протеїну у фракції визначали методом Bradford за його реакцією з реактивом кумасі G-250.

Навантаження мітохондрій NO-чутливим флуоресцентним зондом DAF-FM-DA (diaminofluorescein-FM-diacetate) у концентрації 5 мкмоль/л проводили в середовищі, яке містило 10 ммоль/л Hepes (pH 7,4, 25°C), 250 ммоль/л цукрозу, 0,1% бичачий сироватковий альбумін, 0,02% Pluronic F-127 (для покращення процесу навантаження) протягом 30 хв при 25°C.

Склад робочого (реакційного) середовища при визначенні NO-синтазної активності (об'єм 2 мл, ммоль/л): 20 – Hepes (pH 7,4, 25°C), 2 – K⁺-фосфатний буфер (pH 7,4, 25°C), 125 – KCl, 25 – NaCl, 5 – піруват, 5 – сукцинат, 0,05 – L-аргінін, 0,1 – Ca²⁺, 0,01 – НАДФН, 0,01 – тетрагідробіоптерин (BH₄). Вміст протеїну в мітохондрійній фракції становив 20–25 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти 20 мкл L-аргінін і Ca²⁺. Час інкубації 30 хв. Виміри проводили із застосуванням протокового цитометра COULTER EPICS XL™ («Beckman Coulter», США) з аргоновим лазером ($\lambda_{зб} = 488$ нм, $\lambda_{фл} = 515$ нм; канал F11).

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали загальноприйнятими методами. Вірогідність різниці середнього арифметичного визначали за критерієм t Стьюдента. Розрахунки проводили за допомогою стандартного програмного забезпечення MS Office Excell.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Залучення аденілатциклазного сигнального каскаду в регуляцію синтезу NO в мітохондріях міометрія доводять такі експерименти. У разі пригнічення активності аденілатциклази специфічним інгібітором КН7 (25 мкмоль/л) інтенсивність утворення NO в мітохондріях зменшувалася приблизно вдвічі (рис. 1).

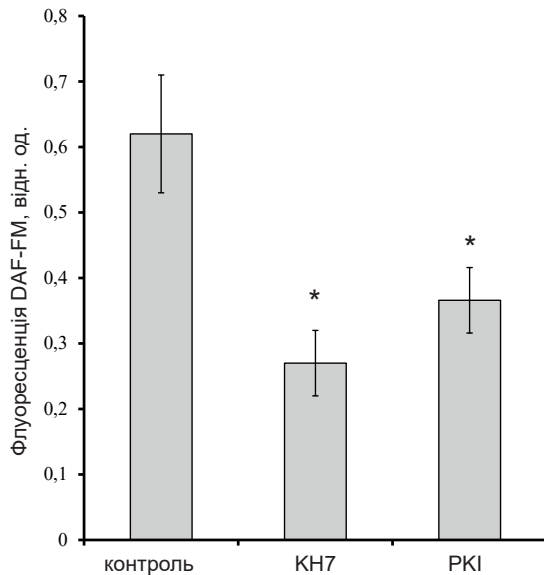


Рис. 1. Зміни інтенсивності синтезу NO за наявності KN7 та PKI; * $P < 0,01$ (KN7), $P < 0,05$ (PKI) відносно контролю ($n = 7$)

За наявності інгібітора протеїнкінази А 10 нмоль/л PKI синтез NO в мітохондріях також суттєво зменшувався.

Синтез NO в мітохондріях підвищувався за дії активаторів аденілатциклази в оптимальних концентраціях: природного HCO_3^- та рослинного лабданового терпеноїду форсколіну, а також неспецифічного інгібітора фосфодіестераз – кофеїну (рис. 2).

Цікавим є результат щодо стимулюючої дії форсколіну. Хоча він і зв'язується з активним центром розчинної аденілатциклази, є окремі відомості, що його активуюча дія саме на цю ізоформу ензиму не демонструється [22]. Втім активний центр аденілатциклаз є досить консервативною структурою, що і пояснює наші результати. Цілком можлива і пряма дія форсколіну на mtNOS, оскільки терпеноїди (сапоніни, глікозиди) є активаторами NO-синтаз [23]. Експериментальні результати свідчать про залучення саме сигнального шляху сАМФ/протеїнкінази А в дію форсколіну через те, що у разі наявності інгібіторів аденілатциклази KN7 та протеїнкінази А у вищезазначених концентраціях активація терпеноїдом синтезу оксиду азоту не спостерігалася (рис. 3). Інший стимулятор HCO_3^- також зв'язується з активним центром і є специфічним саме для розчинної ізоформи аденілатциклази [22].

Вивчали вплив АТФ як субстрату аденілатциклази на синтез NO у мітохондріях. У цій серії досліджень у реакційному середовищі були іони Mg (3 ммоль/л) як кофактора аденілатциклазної реакції [22]. За наявності АТФ синтез оксиду азоту незначно зростає, а за дії сполук, які підвищують вміст цАМФ (NaHCO_3 та кофеїн) ефект посилюється

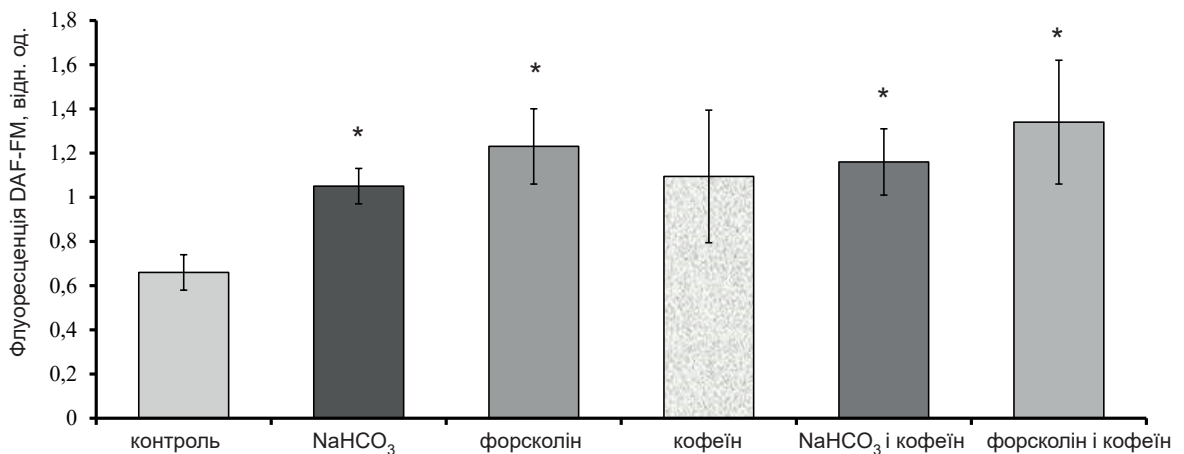


Рис. 2. Зміни інтенсивності синтезу NO за наявності NaHCO_3 (30 ммоль/л), форсколіну (10 мкмоль/л) та кофеїну (1 ммоль/л); * $P < 0,01$ (NaHCO_3), $P < 0,05$ (форсколін, NaHCO_3 і кофеїн, форсколін і кофеїн) відносно контролю ($n = 6$)

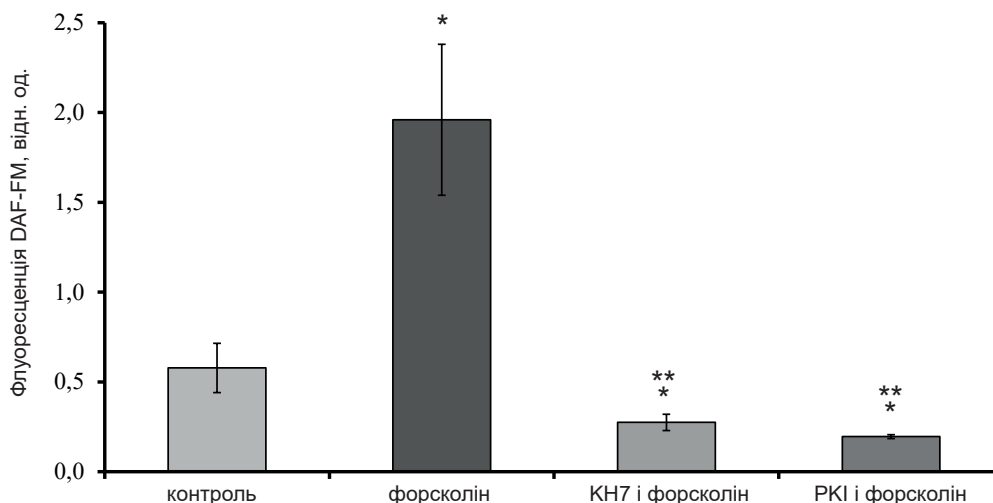


Рис. 3. Зміни інтенсивності синтезу NO за наявності модюляторів аденілатциклазного шляху. * $P < 0,05$ відносно контролю, ** $P < 0,01$ відносно дії форсколіну ($n = 4$)

(рис. 4). Цей результат можна пояснити як додатковою енергізацією мітохондрій внаслідок зворотного функціонування АТФ-синтетази, так і зростанням продукції цАМФ. Останній варіант здається більш імовірним, оскільки за відсутності активаторів утворення останнього зростання синтезу NO при підвищенні концентрації АТФ було не суттєвим.

При внесенні до середовища інкубації інгібітора конститутивних NO-синтаз L-NAME стимулюючого впливу досліджу-

ваних сполук на синтез NO у мітохондріях не спостерігається, що підтверджує зв'язок цих ефектів саме з активацією мітохондріальної NO-синтази (рис. 5).

цАМФ, який продукується розчинною аденілатциклазою, стимулює протеїнкіназу А. Наявність останньої в мітохондріях різних типів клітин у літературі ще дискутується, хоча і передбачається можливість фосфорилування цією кіназою протеїнів як електронно-транспортного ланцюга, так і мат-

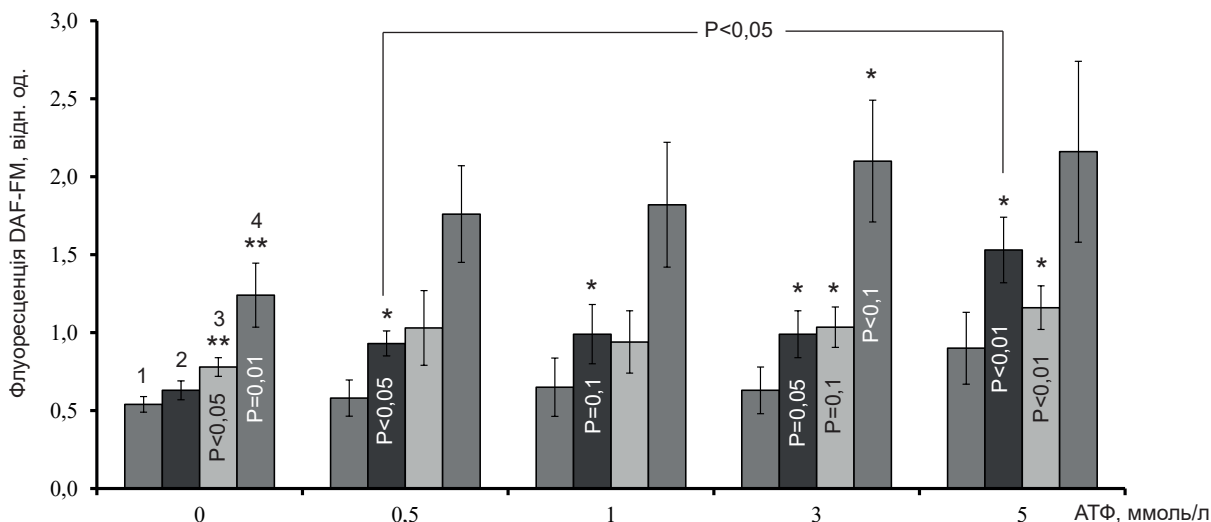


Рис. 4. Зміни інтенсивності синтезу NO за наявності АТФ (0,5–5 ммоль/л) та сполук, що підвищують вміст цАМФ: 1 – контроль, 2 – кофеїн (1 ммоль/л), 3 – NaHCO₃ (30 ммоль/л), 4 – NaHCO₃ і кофеїн. Зміни вірогідні: **відносно контролю без діючих речовин; *відносно дослідів без АТФ ($n = 5$)

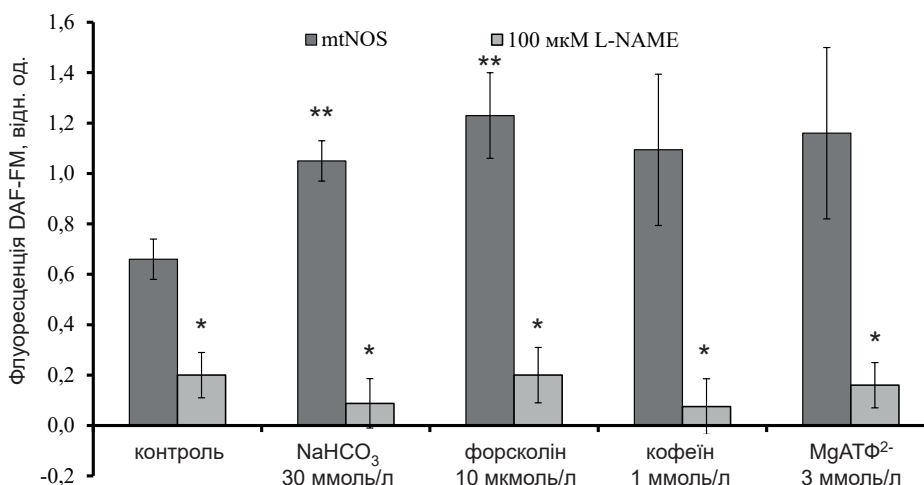


Рис. 5. Зміни синтезу NO під впливом сполук, які підвищують вміст цАМФ у мітохондріях, за наявності інгібітора конститутивних NO-синтаз L-NAME. Зміни вірогідні: ** $P < 0,05$ відносно контролю без діючих речовин; *відносно дії модуляторів ($n = 7$)

риксних метаболічних шляхів. Зокрема припускають, що протеїнкіназа А здійснює регуляторне фосфорилування комплексів дихального ланцюга, ключових ензимів циклу Кребса, β -окиснення жирних кислот, катаболізму амінокислот, транспортерів внутрішньої мітохондріальної мембрани, а також протеїнів, які забезпечують підтримання Ca^{2+} -гомеостазу в мітохондріях. Процес апоптозу також керується РКА [17, 24]. Пригнічення фосфодіестерази 2А в мітохондріях і відповідне зростання вмісту цАМФ у матриксі мало наслідком посилення дихання та окисного фосфорилування [25]

У порівняльному аспекті, згідно з нашими попередніми даними щодо дослідження синтезу оксиду азоту мітохондріями за дії модифікаторів Ca^{2+} - та DAG-залежних ізоформ протеїнкінази С, цей сигнальний шлях навряд чи безпосередньо регулює синтез NO у мітохондріях. Як активатор протеїнкінази С форболовий ефір (1 мкмоль/л РМА), так і інгібітор стауроспорин (0,5 мкмоль/л) суттєво не впливали на утворення оксиду азоту мітохондріями.

Одержані результати дають змогу передбачити залежність синтезу NO у мітохондріях міоцитів від функціональної активності

розчинної аденілатциклази та можливість активаторного фосфорилування mtNOS з боку протеїнкінази А. Припускають, що сигнальний шлях цАМФ/протеїнкіназа А в мітохондріях є своєрідним метаболічним сенсором, який визначає рівень окисного фосфорилування і продукцію активних форм кисню [24, 26]. У цьому сенсі цАМФ-залежна модуляція синтезу NO мітохондріями може виступати важливим регулятором біоенергетики і метаболічних процесів у досліджуваних субклітинних структурах.

ВИСНОВКИ

Таким чином, у мітохондріях гладенького м'яза матки синтез NO підвищується за дії активаторів аденілатциклази HCO_3^- та форсколіну, а також інгібітора фосфодіестераз – кофеїну. У разі пригнічення активності аденілатциклази сполукою КН7, а також за наявності інгібітора протеїнкінази А сполуки РКІ синтез NO в мітохондріях суттєво зменшувався. Ці результати вказують на можливість регуляції синтезу NO в мітохондріях міоцитів з боку сигнального шляху цАМФ/протеїнкіназа А та активаторного фосфорилування mtNOS протеїнкіназою А.

Робота виконувалась за рахунок бюджетного фінансування НАН України № 0119U002508.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

Yu.V. Danylovykh, H.V. Danylovykh, S.O. Kosterin

POSSIBLE IMPORTANCE OF ADENYLATE CYCLASE SIGNALING PATHWAY IN THE SYNTHESIS OF NITRIC OXIDE BY MYOMETRIUM MITOCHONDRIA

Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv; e-mail: danylovychy@biochem.kiev.ua

NO synthase activity (mtNOS) in uterine smooth muscle mitochondria under the action of the cAMP/protein kinase A signaling system modulators was studied. The experiments were performed on isolated mitochondria from rat myometrium using the NO-sensitive fluorescent probe DAF-FM-DA. NO synthesis in mitochondria was increased by adenylate cyclase activators NaHCO_3 (30 mM) and forskolin (10 μM), as well as phosphodiesterase inhibitor caffeine (1 mM). The addition of ATP (0.5-5 mM) caused a slight increase in nitric oxide synthesis. The effect of ATP was enhanced in the presence of NaHCO_3 and caffeine. The intensity of NO formation in mitochondria decreased by approximately 50 % in the case of inhibition of adenylate cyclase activity by the compound KH7 (25 μM). In the presence of the protein kinase A inhibitor PKI (10 nM) NO synthesis in mitochondria was also significantly reduced. When the constitutive NO-synthase inhibitor L-NAME (100 μM) was introduced into the incubation medium, the stimulating effect of the studied compounds on NO synthesis in mitochondria was not observed. These data suggests a possible dependence of mtNOS function on the activity of the cAMP/protein kinase A signaling system in smooth muscle mitochondria.

Key words: nitric oxide; mitochondria; mitochondrial NO-synthase; cyclic adenosine monophosphate; protein kinase A; smooth muscle.

REFERENCES

1. Tatoyan A, Giulivi C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1998; 273(18):11044-48.
2. Akopova OV, Korkach Yu P, Sagach VF. The regulation of mitochondrial NO synthase activity under nitroglycerine application in rat heart and liver mitochondria. *Fiziol Zh.* 2022;68(1):3-12. [Ukrainian].
3. Lores-Arnaiz S, D'Amico G, Czerniczyniec A, Bustamante J, Boveris A. Brain mitochondrial nitric oxide synthase: in vitro and in vivo inhibition by chlorpromazine. *Arch Biochem Biophys.* 2004;430(2):170-7.
4. Boveris A, Valdez LB, Alvarez S, Zabornyj T, Boveris AD, Navarro A. Kidney mitochondrial nitric oxide synthase. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5(3):265-71.
5. Alvarez S, Boveris A. Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic Biol Med.* 2004(9);37:1472-8.
6. Bustamante J, Bersier G, Romero M, Badin RA, Boveris A. Nitric oxide production and mitochondrial dysfunction during rat thymocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 2000;376(2):239-47.
7. Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomemb.* 2004;36(4):341-6.
8. Valdez LB, Zabornyj T, Boveris A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(3):166-72.
9. Franco MC, Antico Arciuch VG, Peralta JG, Galli S, Levisman D, Lopez LM, et al. Hypothyroid phenotype is contributed by mitochondrial complex I inactivation due to translocated neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2006;281(8):4779-86.
10. Persichini T, Mazzone V, Polticelli F, Moreno S, Venturini G, Clementi E, Colasanti M. Mitochondrial type I nitric oxide synthase physically interacts with cytochrome c oxidase. *Neurosci Lett.* 2005;384(3):254-9.
11. Parihar MS, Nazarewicz RR, Kincaid E, Bringold U, Ghafourifar P. Association of mitochondrial nitric oxide synthase activity with respiratory chain complex I. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;366:23-8.
12. Levine AB, Punihaole D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology.* 2012;122:55-68.
13. Danylovykh HV, Danylovykh YuV, Gulina MO, Bohach TV, Kosterin SO. NO-synthase activity in the mitochondria of the uterus smooth muscle: identification and biochemical properties. *Gen Physiol Biohys.* 2019;38(1):39-50.
14. Braun T, Dods RF. Development of a Mn^{2+} -sensitive, "soluble" adenylate cyclase in rat testis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975;72(3):1097-101.
15. Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR. Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem.* 2003; 278(18):15922-26.
16. Zippin JH, Chen Y, Nahirney P, Kamenetsky M, Wuttke MS, Fischman DA, Levin LR, Buck J. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB J.* 2003;17(1): 82-4.
17. Valsecchi F, Konrad C, Manfredi G. Role of soluble adenylyl cyclase in mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(12 Part B):2555-60.

18. Hurley J H. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. J Biol Chem. 1999; 274(12):7599-602.
19. Bitterman JL, Ramos-Espiritu L, Diaz A, Levin LR, Buck J. Pharmacological distinction between soluble and transmembrane adenylyl cyclases. J Pharmacol Exp Ther. 2013;347(3):589-98.
20. Liu C, Ke P, Zhang J, Zhang X, Chen X. Protein kinase inhibitor peptide as a tool to specifically inhibit protein kinase A. Front Physiol. 2020; 11:574030.
21. Kolomiets OV, Danylovych YuV, Danylovych HV, Kosterin SO. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -exchange in myometrium mitochondria. Ukr Biochem J. 2014; 86(3):41-8. [Ukrainian].
22. Wiggins SV, Steegborn C, Levin LR, Buck J. Pharmacological modulation of the $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{pH}$ -, calcium-, and ATP-sensing soluble adenylyl cyclase. Pharmacol Ther. 2018;190:173-86.
23. Veloso C, Rodrigues VG, Ferreira RCM, Duarte LP, Klein A, Duarte ID, Romero TRL, Perez AC. Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K^{+} channels pathway activation in mice. Eur J Pharmacol. 2015;755: 1-5.
24. Amer YO, Hebert-Chatelain E. Mitochondrial cAMP-PKA signaling: What do we really know? Biochim Biophys Acta Bioenerg. 2018;1859(9):868-77.
25. Modis K, Panopoulos P, Coletta C, Papapetropoulos A, Szabo C. Hydrogen sulfide-mediated stimulation of mitochondrial electron transport involves inhibition of the mitochondrial phosphodiesterase 2A, elevation of cAMP and activation of protein kinase A. Biochem Pharmacol. 2013;86(9):1311-9.
26. Di Benedetto GD, Lefkimmiatis K, Pozzan T. The basics of mitochondrial cAMP signalling: where, when, why. Cell Calcium. 2021;93:102320.

*Матеріал надійшов
до редакції 07.06.2022*