УДК 576.31

ВЛИЯНИЕ *L*-АРГИНИНА И ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА НА ИНДУКЦИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ И ПАЛЬМИТОИЛКАРНИТИНОМ. ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ NO/cGMP/PKG СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

© 2020 г. В. В. Дынник^{а,} *, Е. В. Гришина^а, Н. И. Федотчева^а

^аИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия *e-mail: dynnik@rambler.ru Поступила в редакцию 10.05.2019 г. После доработки 07.07.2020 г. Принята к публикации 09.07.2020 г.

Работа посвящена исследованию механизмов защитного действия L-аргинина и донора оксида азота SNAP при индукции циклоспорин А-зависимой митохондриальной поры (MPTP) избытком Са²⁺ или *D*,*L*-пальмитоилкарнитина (PC). Нами было проанализировано возможное вовлечение в регуляцию МРТР сигнальной системы с участием митохондриальных ферментов NO-синтазы (mtNOS), гуанилатциклазы (GC) и сGMP-зависимой протеинкиназы G (PKG) (mtNOS/GC/PKG-SS). Эксперименты были проведены на изолированных митохондриях печени с использованием ингибиторного анализа. Результаты исследований показали, что L-аргинин и SNAP оказывают дозозависимое влияние на открытие МРТР. При низких концентрациях *L*-аргинин и SNAP (5–100 мкМ) активировали защитные механизмы, обеспечивая увеличение кальциевой буферной емкости митохондрий (CRC) и критической (пороговой) концентрации пальмитоилкарнитина (PC*), необходимой для индукции МРТР. При более высоких концентрациях L-аргинин (более 500 мкМ) и SNAP (более 100 мкМ) вызывали противоположный эффект, подавляя дыхание и способствуя открытию поры. Ингибиторы NOS, GC и РКG устраняли защитные эффекты, наблюдавшиеся при малых концентрациях L-аргинина и SNAP. Эксперименты, проведенные с использованием специфического ингибитора индушибельной NOS (W1400). показали, что этот кальший-независимый фермент не участвует в регуляции МРТР в условиях наших экспериментов. На основании полученных результатов можно предположить, что кальций-зависимая митохондриальная сигнальная система mt-NOS/GC/PKG-SS может быть вовлечена в регуляцию МРТР, обеспечивая увеличение CRC и PC*. При высоких концентрациях L-аргинина или SNAP избыток NO преодолевает защиту, обеспечиваемую mtPKG, и способствует открытию поры.

Ключевые слова: *L*-аргинин, доноры оксида азота, NO-синтаза, гуанилатциклаза, протеинкиназа G, митохондриальная пора **DOI:** 10.31857/S0233475520060055

ВВЕДЕНИЕ

Влияние *L*-аргинина, доноров NO и ингибиторов Ca²⁺-зависимой изоформы митохондриальной NO-синтазы (mtNOS) на кальциевую емкость митохондрий (CRC), индукцию митохондриальной поры (МРТР), высвобождение цитохрома С (СуtС) изучается более 25 лет. Полученные за этот период результаты исследований противоречивы. Так, еще в 1999 году было показано, что активация mtNOS Ca²⁺ и *L*-аргинином вызывает высвобождение СуtС, в то время как ингибирование mtNOS уменьшает выход СуtС, повышает митохондриальный потенциал ($\Delta \Psi_m$) и CRC [1]. Позже было обнаружено, что NO вызывает концентрационно-зависимые эффекты [2]. Было показано, что очень низкие или высокие концентрации NO-доноров способствуют набуханию митохондрий, высвобождению СуtС и открытию МРТР, индуцированному избытком ионов кальция. И наоборот, промежуточные кон-

Список сокращений: МРТР – циклоспорин А-зависимая митохондриальная пора; mtNOS – митохондриальная NO-синтаза; GC – гуанилатциклаза; NO – оксид азота; PKG – сGMP-зависимая протеинкиназа G; COX – цито-хром-с-оксидаза; PC – D,L-пальмитоилкарнитин; PC* – критическая (пороговая) концентрация PC, вызывающая индукцию MPTP; CRC – кальциевая емкость митохондрий; CytC – цитохром c; $\Delta \Psi_m$ – митохондриальный мембранный потенциал; VDAC – потенциал-зависимый анионный канал; TPP⁺ – тетрафенилфосфоний.

центрации доноров NO обеспечивают защитные эффекты, уменьшая набухание митохондрий и вероятность открытия поры. Защитные и неблагоприятные воздействия доноров NO объясняли возможным действием S-нитрозотиолов и пероксинитрита, соответственно [1, 2].

Неоднозначные эффекты доноров NO на открытие МРТР также наблюдались в экспериментах, выполненных на клетках. Было показано, что малые концентрации доноров NO уменьшают накопление митохондриального Ca²⁺, а высокие концентрации, наоборот, способствуют выходу Ca²⁺ и открытию МРТР [3]. В этих экспериментах добавленный *L*-аргинин ингибировал поглощение Са²⁺ митохондриями и предотвращал открытие МРТР [2, 4]. Авторы предположили, что внутримитохондриальный NO может быть вовлечен в отрицательную обратную связь, предотвращающую открытие МРТР за счет ингибирования транспорта Ca²⁺ [3]. Согласно другой точке зрения, уменьшение поглощения Ca²⁺ может быть обусловлено деполяризацией митохондрий, вызываемой NO [5].

Представленные выше противоречивые эффекты доноров NO и *L*-аргинина на $\Delta \Psi_m$ и контроль МРТР не могут быть объяснены действием механизмов, основанных только на редокс-регуляции митохондриальных процессов S-нитрозилированием [6, 7] и S-глутатионированием [8–11] различных белков. Потенциальные механизмы защиты могут включать внутримитохондриальные сигнальные цепи, учитывающие взаимодействие кальция и NO и другие, пока неизвестные обратные связи. Недавно Seya и соавторы обнаружили, что митохондриальная фракция сердца обладает активностью сGMP-зависимой протеинкиназы G (РКG) [12]. Продукция сGMP митохондриальной гуанилатциклазой (GC) также была продемонстрирована этой группой [13]. Было показано, что SNAP и 8-Bromo-cGMP способствуют кальций-зависимому высвобождению CytC из митохондрий сердца, вовлекая потенциал-зависимый анионный канал (VDAC) в качестве конечной мишени сигнального пути. Наблюдаемые эффекты предотвращались применением ингибиторов NOS, GC, PKG и VDAC. Гидролиз сGMP митохондриальной фосфодиэстеразой циклических нуклеотидов PDE2A также был продемонстрирован в митохондриях мозга и печени в независимых экспериментах [14]. Эти данные указывают на то, что митохондрии содержат все элементы автономной Ca²⁺-зависимой сигнальной системы: $Ca^{2+} \rightarrow mtNOS \rightarrow NO \rightarrow$ \rightarrow GC \rightarrow cGMP \rightarrow PKG (mtNOS/GC/PKG-SS), которая может участвовать в регуляции митохондриального дыхания [15] и МРТР.

В данной работе были проведены эксперименты на изолированных митохондриях печени крысы, в которых анализировалось влияние агонистов и ингибиторов mtNOS/GC/PKG-SS на диссипацию $\Delta \Psi_m$ и индукцию MPTP, вызываемые избытком Ca²⁺ или пальмитоилкарнитина (PC). Предварительные результаты были опубликованы ранее [16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все процедуры на животных выполнялись в соответствии с директивой ЕС 86/609/ЕЕС и были одобрены комитетом по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Самцов крыс линии Вистар (6-8 недель) содержали в одинаковых условиях в кондиционированных и проветриваемых помешениях при температуре $20-22^{\circ}$ С (свет/темнота = 12 ч/12 ч). Эксперименты проводили при 26°С. Митохондрии печени выделяли с использованием стандартных методик дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 300 мМ сахарозы, 1 мМ EGTA и 10 мМ Трис-HCl (pH 7.4). Митохондриальные препараты дважды промывали средой выделения, не содержащей EGTA, ресуспендировали в среде того же состава и хранили на льду. Инкубационная среда для митохондрий содержала: 125 мМ КСІ, 3 мМ КН₂РО₄, 10 мМ HEPES (pH 7.4), 1 MM MgCl₂. Содержание митохондриального белка определяли методом Лоури с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. Разность электрических потенциалов ($\Delta \Psi_{\rm m}$) на внутренней мембране митохондрий определяли по распределению липофильного катиона тетрафенилфосфония (ТРР⁺), концентрацию которого во внешней среде [TPP⁺]_{он} регистрировали с помощью ТРР+-селективного электрода. Измерение концентрации кальция в среде производили с использованием Са²⁺-селективного электрода (Nico, Москва, Россия). Все эксперименты проводили в закрытой или открытой кювете объемом 1 мл, содержащей 1.0 мг мит. белка, при постоянном перемешивании. В качестве субстратов дыхания использовали *L*-глутамат (10 мМ) и пируват (1 мМ) для поддержания полного оборота цикла Кребса и сохранения субстратного фосфорилирования в цикле. В некоторых экспериментах дыхание митохондрий поддерживалось окислением сукцината (5 мМ) в присутствии ротенона (1-2 мкМ) или пирувата (1 мМ) и L-малата (5 мМ). Все эксперименты выполнялись в присутствии 10 ед. гексокиназы, 10 мМ глюкозы и 1 мМ MgCl₂. Последующие добавки 0.75 мМ ADP обеспечивали высокую стационарную скорость дыхания (VO_{2SS}), которая была близка к максимальной скорости дыхания, наблюдающейся в Состоянии 3 (VO_{2SS} = 80-85%от VO_{2max} (V₃)). Часть экспериментов была выполнена при низкой скорости дыхания митохондрий, в отсутствие гексокиназы и ADP в среде (Состояние 4, V₄). Скорость набухания митохондрий ($V_{SW} = \Delta \text{ o.d.}/\text{мин}$) определялась в открытой кювете объемом 2 мл при 0.35 мг. мит. белка на 1 мл с использованием спектрофотометра Осеап Optics USB4000. Открытие MPTP регистрировали как: выход кальция из митохондрий в инкубационную среду; диссипацию митохондриального потенциала $\Delta \Psi_{\rm m}$; набухание митохондрий. Индукция МРТР достигалась путем последовательных добавок в инкубационную среду 20 мкМ Са²⁺ (CaCl₂) или 20 мкМ РС. Критические концентрации Ca²⁺ или PC, необходимые для индукции поры, представляют митохондриальную кальциевую буферную емкость (CRC) и пороговую концентрацию РС (РС*). Величины этих параметров характеризуют чувствительность комплекса МРТР к действию различных модуляторов поры. Влияние mtNOS/PKG-SS на открытие MPTP оценивали путем определения значений CRC, PC* и V_{SW} , соответственно. Активацию mtNOS-SS обеспечивали введением в среду инкубации L-аргинина, NO доноров или Ca²⁺. 7-NI, ODQ и KT5823 были использованы для ингибирования mtNOS, GC и PKG соответственно. В работе использованы реактивы фирмы "Sigma" (США). Статистический анализ экспериментальных данных проводился с использованием *t*-критерия с использованием SigmaPlot 11. Данные представлены как среднее значение \pm S.E.M. n = 4-6 независимых экспериментов. За уровень значимости было принято *p* < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция МРТР избытком кальция и защитые эффекты L-аргинина. На рис. 1*а* показано, что при последовательных добавках 20 мкМ Ca²⁺ в контроле CRC составляет 100 мкМ (нижняя кривая). Преинкубация митохондрий с 300 мкМ L-аргинина приводит к увеличению CRC до 180 мкМ. Введение в среду инкубации ингибитора NOS 7NI (100 мкМ) уменьшает величину CRC до 80 мкМ, при достижении которой происходит диссипация $\Delta \Psi_m$ (рост TPP⁺ в среде, верхняя кривая). Преинкубация митохондрий с селективным ингибитором iNOS 1400W (50–100 нМ) не влияла на величину CRC, что свидетельствует об отсутствии iNOS в митохондриях в исследуемых условиях.

Защитный эффект *L*-аргинина также устраняется ингибиторами GC (100 мкМ ODQ, рис. 1*б*, верхняя кривая) и PKG (1.5 мкМ КТ5823, рис. 1*в*, верхние кривые). Из рис. 1*в* видно, что уменьшение $\Delta \Psi_m$ (верхняя кривая) сопряжено с выбросом Ca²⁺ из митохондрий (нижние кривые). Видно также, что преинкубация митохондрий с КТ5823, селективным ингибитором РКG, уменьшает CRC от 180 до 120 мкм.

Эти данные свидетельствуют о том, что защитный эффект L-аргинина, направленный на уменьшение вероятности индукции поры избытком Ca²⁺, может быть обусловлен функционированием mtNOS/GC/PKG-SS, эффектором которой является PKG. Можно предположить, что наблюдаемый защитный эффект L-аргинина связан с фосфорилированием структурных элементов комплекса белков MPTP с участием PKG.

Влияние скорости дыхания митохондрий на РСиндуцированное открытие МРТР и защитный эффект SNAP. Известно, что скорость продукции NO mtNOS экспоненциально зависит от величины $\Delta \Psi_m$ и максимальна в Состоянии 4 [17, 18]. Кроме того, хорошо известно, что вероятность открытия поры различными агентами сильно уменьшается при наличии аденилатов, гексокиназы и Mg²⁺ в среде инкубации [19, 20]. Последнее может быть связано со стабилизацией конформации элементов макрокомплекса МРТР, включая транслокатор аденилатов, АТР-синтазу и др. В наших условиях, в присутствии избытка гексокиназы и глюкозы в среде, добавка 0.75 мМ ADP увеличивает скорость дыхания митохондрий от $VO_2 = 20 - 24$ нг-атом О/мин/мг (V4, Состояние 4, ADP = 0) до стационарных значений $VO_{2SS} = 70 -$ 77 нг-атом O/мин/мг (VO₂ = 80-90% от скорости дыхания в Состоянии 3). Результаты, представленные на рис. 2, показывают, что в митохондриях, находящихся в состоянии активного дыхании (VO_{2SS}), критические величины PC* в контроле и в присутствии SNAP выше, чем в Состоянии 4 (V4). Сравнение верхних кривых, представленных на рис. 2, показывает, что в митохондриях, находящихся в Состоянии 4 (верхняя линия на рис. 2*a*), 40 мкм PC вызывает диссипацию $\Delta \Psi_{m}$, тогда как в состоянии с высокой скоростью дыхания (верхняя линия на рис. 2δ), критическая концентрация РС* превышает 60 мкМ. В присутствии 20 мкМ SNAP в Состоянии 4 величина РС* увеличивается до 80 мкМ, в то время как при высокой скорости дыхания (VO₂₅₅) величина РС* составляет 100 мкМ и выше (нижние линии на рис. 2а, 2б).

Диссипация $\Delta \Psi_m$, ингибирование дыхания и набухание митохондрий, вызываемые PC. Защитный эффект циклоспорина А. Преинкубация митохондрий с пируватом, *L*-глутаматом и низкими концентрациями PC (20 мкМ) повышает $\Delta \Psi_m$ и увеличивает стационарную скорость митохондриального дыхания на 35–40% по сравнению со значениями, достигнаемыми при дыхании митохондрий в присутствии пирувата и *L*-глутамата (VO_{2SS} = 85–88 нг-атом О/мин/мг). Напротив, высокие дозы PC (выше 50 мкМ) вызывают быст-



Рис. 1. Диссипация $\Delta \Psi_{\rm m}$ и индукция МРТР ионами Ca²⁺. Защитный эффект *L*-аргинина (300 мкМ) и его устранение ингибиторами белков системы mtNOS/GC/PKG-SS: 7NI (*a*, 100 мкМ), ODQ (*б*, 100 мкМ) и KT5823 (*в*, 1.5 мкМ, KT), соответственно. Представлены репрезентативные эксперименты. Митохондрии инкубировали в открытой камере объемом 1 мл. Среда инкубации (см. Материалы и методы) включала 1 мМ пирувата, 10 мМ *L*-глутамата и гексокиназу. Добавки Ca²⁺ и PC (по 20 мкМ), а также ADP показаны стрелками.

рую диссипацию $\Delta \Psi_m$ увеличение [TPP⁺] и прогрессирующее угнетение дыхания. Этот процесс развивается вскоре после добавки ADP (рис. 3*a*, черные линии). Преинкубация митохондрий с CsA предотвращает падение $\Delta \Psi_m$, несмотря на сильное подавление дыхания (рис. 3*a*, серые линии). Помимо диссипации $\Delta \Psi_m$ и подавления ды-

ГPP, MKM

TPP⁺, MKM

ТРР⁺ (0.2 мкМ)

хания, PC вызывает набухание митохондрий. Как показано на рис. 3*б*, низкие концентрации PC (20 мкМ) вызывают набухание митохондрий, которое характеризуется скоростью набухания $V_{SW} = 0.26 \Delta$ o.d./мин (черная кривая). Преинкубация митохондрий с CsA (2 мкМ) предотвращает этот эффект. Вторая добавка 20 мкМ PC приво-



Рис. 2. Влияние скорости дыхания митохондрий на диссипацию $\Delta \Psi_m$ избытком PC и на защитный эффект SNAP. Представлены репрезентативные эксперименты. Инкубационная среда включала 10 мМ *L*-глутамата и 1 мМ пирувата, а также гексокиназу и глюкозу. Эксперименты, представленные на панели *a*, проведены в отсутствие ADP в среде (Состояние 4). На панели *б* высокая скорость дыхания (VO₂ = 80–90% от скорости дыхания в Состоянии 3) обеспечивалась добавками 0.75 мМ ADP. На панелях *a* и *б* черные (верхние) линии соответствуют контрольным экспериментам ([SNAP] = 0), а серые линии – опытам, в которых инкубационная среда содержала 20 мкМ SNAP. Добавки Ca²⁺ и PC (по 20 мкМ), а также ADP показаны стрелками.

дит к быстрому митохондриальному набуханию, характеризующемуся $V_{SW} = 2.4 \Delta \text{ o.d.}/\text{мин}$ (черная кривая). Однако в этом случае CsA обеспечивает ограниченный защитный эффект, уменьшая V_{SW} в четыре раза до 0.57 Δ o.d./мин и не оказывая влияния на амплитуду набухания (серая кривая). Таким образом, наряду с кальцием PC является важным агентом, вызывающим индукцию MPTP.

Кальций и активные формы кислорода (АФК) обычно считаются ключевыми медиаторами, участвующими в индукции МРТР и гибели клеток [20, 21]. Однако ишемия/реперфузия и некоторые другие патологические процессы, помимо роста Ca²⁺ и АФК, характеризуются накоплением длинноцепочечных жирных кислот [22, 23] и их карнитиновых производных [23], которые окисляются в митохондриях в виде ацил-КоА. Хорошо известно, что длинноцепочечные ацил-КоА (C14 и выше) ингибируют различные NAD(P)H-зависимые дегидрогеназы [24]. Наши предварительные результаты показали, что РС индуцирует СsA-зависимую диссипацию $\Delta \Psi_m$ в митохондриях печени [16]. Поэтому в настоящем исследовании для изучения влияния mtNOS/GC/PKG-SS на MPTP в качестве параметров "чувствительности" поры к токсинам были использованы величины CRC и PC*, определяемые при нагрузке митохондрий кальцием и PC.

Влияние модуляции активности mtNOS/GC/ PKG-SS на PC*. Чтобы оценить статистическую достоверность полученных результатов, были определены средние величины PC* в сериях из четырех—шести экспериментов. Рассчитанные средние значения PC* представлены на рис. 4 в виде столбиков. Первый серый столбик соответствует контрольным экспериментам. Влияние SNAP и L-аргинина, а также ингибиторов 7-NI (100 мкМ), ODQ (100 мкМ), КТ5823 (1.5 мкМ) и 1400W (100 нМ) на средние величины PC* показано на рис. 4. Видно, что увеличение концентрации SNAP до 100 мкМ (2 и 3 столбики) увеличивает критическое значение PC* до 109.2 \pm 8.1 мкМ,



Рис. 3. Избыток PC вызывает диссипацию $\Delta \Psi_m$ и подавление дыхания (*a*), а также набухание митохондрий (*b*). Присутствие циклоспорина A (CsA, 1.5 мкМ) в среде препятствует диссипации $\Delta \Psi_m$, набуханию митохондрий и индукции поры (*b*). Представлены репрезентативные эксперименты. *a* – Влияние избытка PC (50 мкМ) и CsA (1.5 мкМ) на митохондриальное дыхание (линии O₂) и $\Delta \Psi_m$ (линии TPP⁺). Инкубационная среда включала 10 мМ *L*-глутамата и 1 мМ пирувата. Митохондрии инкубировали с PC (черные линии) или с PC и CsA (1.5 мкМ, серые линии). Все остальные условия как на рис. 1. *b* – Набухание митохондрий, вызываемое добавлением PC в отсутствие (нижние черные линии) и в присутствии CsA (2 мкМ, верхние серые линии) в среде. Максимальные значения скорости набухания (V_{SW}, выраженные в изменениях ед. оптической плотности/мин; V_{SW} = Δ о.d./мин) указаны на рисунке. 0.75 мМ ADP добавляли за 1 мин до первого введения PC. Инкубационная среда включала 5 мМ сукцината и 2 мкМ ротенона. Все остальные условия как на рис. 1.



Рис. 4. Влияние модуляции активности mtNOS/GC/PKG-SS на величину PC*. Столбики представляют средние значения величин PC* \pm S.E.M, полученные в 4–6 экспериментах при последовательных добавках 20 мкМ PC, подобно тому, как это показано на рис. 1 для Ca²⁺. Инкубационная среда такая же, как и на рис. 1. 20 мкМ Ca²⁺ добавляли через 1 мин после активации дыхания 0.75 мМ ADP, затем митохондрии нагружали PC. Концентрации SNAP, *L*-аргинина (Arg), 7-NI, ODQ, КТ5823 (КТ) и 1400W приведены в мкМ. n = 4 (столбики 1–3), n = 6 (столбики 4–9). Линии над столбиками показывают сравниваемые пары величин PC*. * p < 0.05.

что на 28% выше величины PC* в контроле (84.3 \pm \pm 7.8 мкМ (1 столбик). Сходный защитный эффект вызывает преинкубация митохондрий с 20 мкМ *L*-аргинина (6 столбик).

Видно, что ингибиторы mtNOS/GC/PKG-SS 7-NI, ODQ и KT5823 устраняют защитные эффекты L-аргинина и SNAP, уменьшая критические (пороговые) концентрации PC*, необходимые для индукции поры (рис. 4, столбики 4, 5 и 7, 8), до величин ниже контрольных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, основываясь на результатах, полученных с помощью ингибиторного анализа, можно предполагать участие митохондриальной mtNOS/GC/PKG-SS в регулянии MPTP. Слелует отметить, что mtNOS/GC/PKG-SS нельзя рассматривать как избыточный элемент в многоуровневом контроле окислительного фосфорилирования и индукции МРТР. Будучи зависимой от кальция, эта сигнальная система может участвовать в функционировании нескольких петель обратной связи, две из которых направлены на активацию митохондриального дыхания и на уменьшение вероятности индукции МРТР. В этом случае митохондриальная PKG, наряду с цитозольной PKG1, может рассматриваться как конечный эффектор защиты, участвующий в контроле МРТР.

Вклад авторов: ВВД координировал проект и написал рукопись. НИФ и ЕВГ провели эксперименты, проанализировали и обсудили данные. НИФ приняла участие в доработке статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-01695 ВД).

Благодарности. Авторы благодарят М.А. Симонову, М.Х. Галимову и А.И. Сергеева за техническую поддержку.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ghafourifar P., Schenk U., Klein S.D., Richter C. 1999. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. J. Biol. Chem. 274 (44), 31185–31188. https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31185
- Brookes P.S., Salinas E.P., Darley-Usmar K., Eiserich J.P., Freeman B.A, Darley-Usmar V.M., Anderson P.G. 2000. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 275 (27), 20474– 20479.

https://doi.org/10.1074/jbc.M00.10.77200

 Dedkova E.N., Blatter L.A. 2005. Modulation of mitochondrial Ca²⁺ by nitric oxide in cultured bovine vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289 (4), C836–C845.

https://doi.org/10.1152/ajpcell.00011.2005

- Dedkova E.N., Blatter L.A. 2009. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. J. Physiol. 587 (4), 851–872. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165423
- Davidson S.M., Duchen M.R. 2006. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance. *Cardiovasc. Res.* 71 (1), 10–21. https://doi.org/10.1016/jcardiores.2006.01.019
- Piantadosi C.A. 2012. Regulation of mitochondrial processes by protein S-nitrosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1820 (6), 712–721. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.03.008
- Chang A.H., Sancheti H., Garcia J., Kaplowitz N., Cadenas E., Han D. 2014. Respiratory substrates regulate S-nitrosylation of mitochondrial proteins through a thiol-dependent pathway. *Chem. Res. Toxicol.* 27 (5), 794–804. https://doi.org/10.1021/tx400462r

1111ps.//doi.org/10.1021/1x4004621

 Queiroga C.S., Almeida A.S., Martel C., Brenner C., Alves P.M., Vieira H.L. 2010. Glutathionylation of adenine nucleotide translocase induced by carbon monoxide prevents mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 285 (22), 17077– 17088.

https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065052

- Yap L.P., Garcia J.V., Han D.S., Cadenas E. 2010. Role of nitric oxide-mediated glutathionylation in neuronal function: potential regulation of energy utilization. *Biochem. J.* 428 (1), 85–93. https://doi.org/10.1042/BJ20100164
- Mailloux R.J., Willmore W.G. 2014. S-glutathionylation reactions in mitochondrial function and disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 2, 68. https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00068
- Mailloux R.J., Treberg J.R. 2016. Protein S-glutathionlyation links energy metabolism to redox signaling in mitochondria. *Redox Biol.* 8, 110–118. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.12.010
- Seya K., Ono K., Fujisawa S., Okumura K., Motomura S., Furukawa K. 2013. Cytosolic Ca²⁺-induced apoptosis in rat cardiomyocytes via mitochondrial NO-cGMPprotein kinase G pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **344** (1), 77–84. https://doi.org/10.1124/jpet.112.198176
- Seya K., Motomura S., Furukawa K. 2007. Cardiac mitochondrial cGMP stimulates cytochrome c release. *Clin. Sci. (Lond.).* **112** (2), 113–121. https://doi.org/10.1042/CS20060144
- Acin-Perez R., Russwurm M., Günnewig K., Gertz M., Zoidl G., Ramos L., Buck J., Levin L.R., Rassow J., Manfredi G., Steegborn C. 2011. A phosphodiesterase 2A isoform localized to mitochondria regulates respiration. J. Biol. Chem. 286 (35), 30423–3032. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266379
- Dynnik V.V., Grishina E.V., Fedotcheva N.I. 2019. Implication of mitochondrial NO/cGMP/PKG signaling system in the activation and inhibition of mitochondrial

respiration by L-arginine and NO donors. Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 13 (4), 334-340. https://doi.org/10.1134/S1990747819040056

- 16. Grishina E.V., Galimova M.H., Djafarov R.H., Sergeev A.I., Fedotcheva N.I., Dynnik V.V. 2016. Induction of cyclosporine-sensitive mitochondrial permeability transition pore by substrates forming acetyl-CoA under normal conditions and in type 2 diabetes. Biochemistry (Moscow). Supplement Series A. Membrane *and Cell Biology*. **10** (1), 11–18. https://doi.org/10.1134/S1990747815050049
- 17. Boveris A., Valdez L.B., Zaobornyj T., Bustamante J. 2006. Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. Biochim. Biophys. Acta. 1757 (5-6), 535-542. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.02.010
- 18. Valdez L.B., Zaobornyj T., Boveris A. 2006. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. Biochim. Biophys. Acta. 1757 (3), 166-172.

https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.02.013

19. Giorgio V., Guo L., Bassot C., Petronilli V., Bernardi P. 2018. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. Cell Calcium. 70, 56-63. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.004

20. Lemasters J.J., Theruvath T.P., Zhong Z., Nieminen A.L. 2009. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. Biochim. Biophys. Acta. 1787, 1395 - 1401. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2009.06.009

21. Halestrap A.P. 2010. A pore way to die: The role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. Biochem. Soc. Trans. 38 (4), 841-860. https://doi.org/10.1042/BST0380841

- 22. Yamada K.A., McHowat J., Yan G.X., Donahue K., Peirick J., Cleber A.G. Corr P.B. 1994. Cellular uncoupling induced by accumulation of long-chain acylcarnitine during ischemia. Circ. Res. 74 (1), 83-95. https://doi.org/10.1161/01.res.74.183
- 23. De Windt L.J., Willems J., Roemen T.H., Coumans W.A., Reneman R.S., Van Den Vusse G.J., Bilsen M.V. 2001. Ischemic-reperfused isolated working mouse hearts: Membrane damage and type IIA phospholipase A2. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 280 (6), H2572-H2580.

https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2572

24. Lai J.C., Cooper A.J. 1991. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: Differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. Neurochem. Res. 16 (7), 795-803.

Impact of L-Arginine and Nitric Oxide Donors on the Induction of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Calcium Ions and Palmitoylcarnitine. Possible Involvement of Mitochondrial NO/cGMP/PKG Signal System

V. V. Dvnnik^{1,} *, E. V. Grishina¹, N. I. Fedotcheva¹

¹Institute for Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia *e-mail: dvnnik@rambler.ru

The work is devoted to the study of the impact of L-arginine and nitric oxide donor SNAP on the induction of cyclosporin A-dependent mitochondrial permeability transition pore (MPTP) evoked by the excess of Ca^{2+} or D,L-palmitoylcarnitine (PC). We analyzed a possible involvement of mitochondrial NO-dependent signaling system in the regulation of MRTP. This system includes NO synthase (mtNOS), guanylate cyclase (GC), and cGMP-dependent protein kinase G (PKG) (mtNOS/GC/PKG-SS). Experiments were performed on isolated rat liver mitochondria with application of the inhibitors of NOS, GC, and PKG. The results showed that L-arginine and SNAP exert concentration-dependent effects on the MPTP opening induced by Ca^{2+} or PC excess. At low concentrations (5–100 μ M), L-arginine and SNAP exerted protective effects by increasing the mitochondrial calcium retention capacity (CRC) and critical (threshold) concentration of PC* required for the MPTP opening. At high concentrations, L-arginine and NO donors produced opposite effects, by inhibiting respiration and promoting the pore opening. Inhibitors of NOS, GC, and PKG eliminated protection observed at low concentrations of L-arginine and SNAP. Application of a specific inhibitor of inducible NOS (W1400) did not cause any effect, which indicates that this calcium-independent enzyme is not involved in the MPTP control in the applied experimental conditions. These results suggest that calcium-dependent mitochondrial mtNOS/GC/PKG-SS may be involved in the MPTP control by increasing CRC and PC* values. At high concentrations of L-arginine or SNAP, the NO excess overcomes the protecting action of mtPKG and promotes the pore opening.

Keywords: L-arginine, nitric oxide donors, mitochondrial NO synthase, guanylate cyclase, protein kinase G, mitochondrial respiration, permeability transition pore