

А.В.Дмитрієва, Ю.О.Бубнова, А.Ю.Богуславський, В.Ф.Сагач

Реакції ізольованих міокардіальних препаратів на феніларсиноксид в умовах модуляції чутливості мітохондріальної пори

На суперфузурованих ізольованих препаратах кільцевих полосок из общей сонной артерии и трабекулы из ушка правого предсердия старых морских свинок исследовали чувствительность митохондриальной поры (МП) к действию её индукторов и модуляцию этой чувствительности при помощи экзогенного донора NO – нитропрусида натрия и гипоксического preconditionирования (ГП). Продемонстрировано протекторное действие донора NO и ГП на миокард и артериальные сосуды старых животных за счёт уменьшения чувствительности МП миокарда к её активаторам. В то же время сократительный ответ на контрольную электрическую стимуляцию трабекулы и артериальной полоски животных, которым проводились интервальные гипоксические тренировки, был почти вдвое ниже, чем в группе нетренированных, что может свидетельствовать об исчерпании внутренних ресурсов миокарда при гипоксической тренировке старых животных.

ВСТУП

Доведено, що мітохондріальна поря (МП) є основним тригером розвитку апоптозу та некротичних уражень органів і систем організму [4, 9, 12, 15, 16, 18]. Останні дослідження вказують на виключну роль неконтрольованого тривалого відкриття МП у розвитку реперфузійних і токсичних уражень серцево-судинної системи. З віком в організмі вповільнюються метаболічні процеси, знижуються фізіологічні функції та зменшуються адаптаційні можливості. З іншого боку, прогресивно підвищується чутливість старих клітин до дії негативних чинників, які зумовлюють та/або полегшують відкриття МП. Нині також активно вивчається роль NO в регуляції чутливості МП до дії її активаторів [1, 5, 7, 10, 11, 17]. Гіпоксичне preconditionування може попереджати тривале неконтрольоване відкриття МП у зрілих тварин і, таким чином, попереджати реперфузійні пошкодження тканин [8]. Проте недостатньо вив-

чено, як воно впливає на чутливість МП до дії активаторів у старих тварин і яку роль у цьому процесі відіграє NO. Тому метою нашої роботи було дослідити зміни реакції міокардіальних і судинних препаратів до дії феніларсиноксиду (ФАО) активаторів під впливом модуляторів чутливості МП: донорів NO та гіпоксичного preconditionування у старих тварин.

МЕТОДИКА

В експериментах на суперфузованих ізольованих препаратах кільцевих смужок із загальної сонної артерії та трабекули з вухка правого передсердя зрілих і старих морських свинок досліджували чутливість МП до дії її індукторів та модуляцію цієї чутливості за допомогою екзогенного донора NO нітропрусида натрію (10^{-5} моль/л).

Швидко відпрепаровані міокардіальні та судинні препарати переносили в термостатовану двокамерну установку, яка давала можливість як послідовної, так і ізольованої

© А.В.Дмитрієва, Ю.О.Бубнова, А.Ю.Богуславський, В.Ф.Сагач

їх перфузії сольовим розчином Кребса–Хензеляйта, до складу якого входили (ммоль/л): NaCl – 118, KCl – 4,7, MgSO₄ – 1,2, NaHCO₃ – 24, KH₂PO₄ – 1,2, глюкоза – 10, CaCl₂ – 2,5 при температурі 29–31°C. В експериментах використовували синхронну та послідовну електричну стимуляцію ізольованих препаратів з такими параметрами: 5 Гц, 50 мс, 30 В [6].

Оксидативний стрес для міокардіальної трабекули моделювали за допомогою її інкубації в розчині індуктора МП ФАО (10⁻⁶–10⁻⁵ моль/л) протягом 2–3 хв [14], після чого розчин з ФАО видаляли, камеру додатково промивали контрольним розчином і тільки після цього відновлювали послідовну перфузію препаратів. Судинну смужку під час інкубації трабекули з ФАО ізольовано перфузували контрольним сольовим розчином.

Інтервальне гіпоксичне тренування (ІГТ) тварин проводили протягом 7 діб за схемою: п'ять періодів гіпоксичного впливу тривалістю 15 хв кожний і нормоксичні інтервали між ними, тривалість яких становила також 15 хв. Під час гіпоксичного впливу тварини дихали повітряною сумішшю з 12%-м вмістом кисню. Для з'ясування ролі аденозину та його похідних в ефектах гіпоксичного прекодиціювання використовували блокатор утворення аденозину (5'ізобутил-5'деоксі-аденозин, 5 · 10⁻⁵ моль/л). Статистичну обробку результатів проводили за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У наших попередніх дослідженнях продемонстровано, що в умовах під час ішемії–реперфузії міокарда відбувається активація МП. Цей процес супроводжується вивільненням із ішемізованого міокарда під час його реперфузії стабільного фактора, який має потужний розслаблювальний ефект [3–5]. Спектрофотометрія відтікаючого від

серця розчину і додаткові дослідження на ізольованих мітохондріях виявили наявність у цих розчинах мітохондріального фактора (МФ), концентрація якого тісно корелювала зі ступенем пригнічення функції серця [3, 5]. Також показано, що МФ, який вивільнюється з міокарда під час ішемії–реперфузії, може здійснювати паракринну регуляцію не лише скорочувальної активності серця, гладеньком'язових клітин коронарних судин, але і гуморально зумовлені зміни тону периферичних судин [7] відповідно до ступеня ушкодження міокарда.

У дослідженні було використано хімічний активатор МП ФАО, який за даними літератури призводить до різкого підвищення внутрішньоклітинного вмісту кальцію, модуляції тіолових груп мембранних структур та загибелі клітин [14]. Такі властивості препарату вже дають змогу використовувати його як активатор МП, але останнім часом з'явилися дані про прямий вплив ФАО на структурні компоненти МП, а саме на тіолові групи, що призводить до її відкриття [11]. Експерименти з інкубацією трабекули в розчині з ФАО і наступна реперфузія ізольованого міокардіального препарату та послідовна перфузія судинної смужки призводили до відтворення реакцій глибокого розслаблення як міокардіального, так і судинного препаратів. За характером та амплітудою реакції були подібні до таких, які були зареєстровані під час перфузії ізольованих препаратів розчином, що відтікав від реперфузованого ішемізованого серця [3]. Додатковим підтвердженням ідентичності процесів було визначення рівня МФ, який вивільнювався із міокарда за умов його перфузії розчином з ФАО [4]. Отже, ми одержали модель, що легко відтворює ушкодження міокарда, яке спричиняє активація МП, і реакцію периферичних судин на його реперфузію.

В експериментах на ізольованих препаратах було з'ясовано, що дія індуктора МП ФАО є дозозалежною (рис. 1). Але слід

підкреслити, що діючі дози ФАО знаходились у межах одного порядку. Попередні досліди показали [4], що дія ФАО в дозі 10^{-6} моль/л змінювала реакції ізольованих препаратів на електричну стимуляцію не завжди вірогідно, а використання дози 10^{-5} моль/л призводило до майже повного пригнічення скорочувальних відповідей судинних і, особливо, міокардіальних ізольованих препаратів. Тому надалі ми користувалися середньою дозою $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, яка давала виразний розслаблювальний ефект на міокардіальні та судинні препарати, але не пригнічувала повністю скорочувальну активність ізольованих препаратів.

У контрольних умовах реперфузія інкубованої з ФАО трабекули супроводжувалася зниженням тонічного напруження як самої трабекули (на $3,82 \text{ мН} \pm 0,4 \text{ мН}$), так і кільцевої артеріальної смужки (на $2,8 \text{ мН} \pm 0,36 \text{ мН}$). У старих тварин відбувалася значна потенціація розслаблювальної дії ФАО на міокардіальну трабекулу, тонічне напруження якої знижувалося на 190 % ($11,06 \text{ мН} \pm 1,33 \text{ мН}$, $P < 0,001$) відносно контрольних значень (рис. 2). Водночас дилататорний вплив відтікаючого від реперфузованої трабекули розчину на

артеріальну смужку збільшувався лише на 11 % ($3,1 \text{ мН} \pm 0,4 \text{ мН}$). Також істотно не відрізнялися від контрольних скорочувальні відповіді ізольованих препаратів старих нетренованих тварин на тестову електричну стимуляцію. Проте слід зазначити, що скорочувальні відповіді інтактних ізольованих препаратів старих тварин на електричну стимуляцію були майже вдвічі вищими за значення у контрольних тварин (рис. 3,а). Тобто, ізольована трабекула старих нетренованих тварин більш чутлива до пошкоджувальної дії ФАО ніж контрольна, що свідчить про значне збільшення чутливості МП до дії активаторів у міокарді старих тварин.

У групі старих тварин, яких піддавали попередньому гіпоксичному тренуванню, дилататорна дія ФАО на трабекулу збільшувалась на 148 % ($9,46 \text{ мН} \pm 1,13 \text{ мН}$), що вірогідно менше, ніж у нетренованої групи, а тонічне напруження артерії збільшилося на 12,5 % ($2,45 \text{ мН} \pm 0,29 \text{ мН}$; див. рис. 2). Крім того, ми зареєстрували тонічне напруження міокардіального препарату в умовах тестової електричної стимуляції, яке було втричі вищим порівняно з нетренованою групою (див. рис. 3), що свідчить про кращий функціональний стан

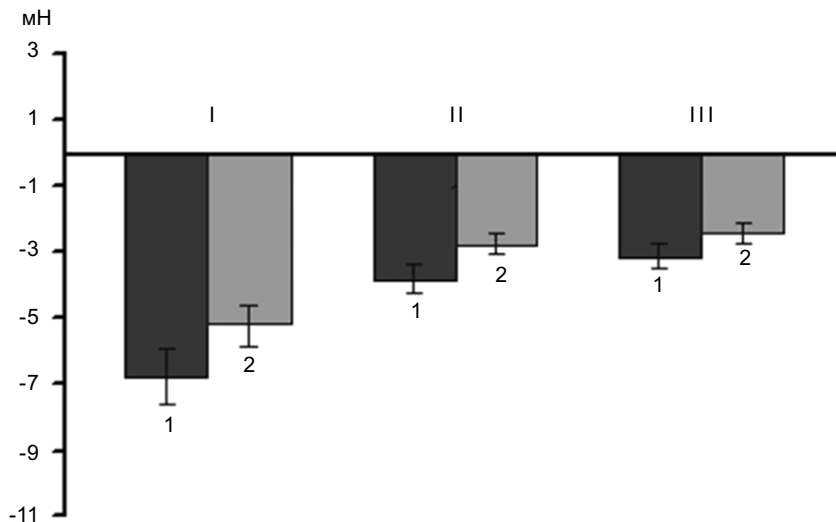


Рис. 1. Зміни тонічного напруження міокардіальної трабекули (1) та артеріальної смужки (2) під впливом активатора мітохондріальної пори феніларсиноксиду (I – 10^{-5} моль/л, II – $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, III – 10^{-6} моль/л; n=6)

міокарда в групі старих тренуваних тварин з гіпоксичним прекодиціонуванням. Таким чином, гіпоксичне прекодиціонування у старих тварин позитивно впливає на функціональний стан серцево-судинної системи і зменшує чутливість МП до дії її індукторів.

Попередня перфузія ізольованих міокардіальних і судинних препаратів старих нетренованих тварин розчином з донором NO – нітропрусидом натрію справляла дію, яка була подібною до впливу гіпоксичного прекодиціонування (рис. 4). Розслаблювальна дія ФАО на міокардіальну трабекулу була в цьому разі більшою за контрольну тільки на 113 % ($8,15 \text{ мН} \pm 0,97 \text{ мН}$, $P < 0,01$), а розслаблювальний вплив розчину, який відтікав від реперфузованої міокардіальної трабекули на артеріальну смужку, збільшувався на 7 % ($3,0 \text{ мН} \pm 0,36 \text{ мН}$). Також у цих умовах відбувалося збільшення скорочувальних відповідей на контрольну стимуляцію як міокардіальної трабекули (на 41 %), так і судинної смужки (на 3,6 %). Наведені результати свідчать про протекторну дію донора NO на міокардіальні та артеріальні судинні препарати старих

нетренованих тварин насамперед внаслідок зменшення чутливості МП міокарда до дії її індукторів.

Однак у серії експериментів з ізольованими препаратами старих тварин, яких піддавали гіпоксичному прекодиціонуванню, були отримані дещо неочікувані результати. Попередня перфузія ізольованих препаратів розчином з нітропрусидом натрію дещо збільшувала негативний вплив ФАО на міокардіальну трабекулу, тонічне напруження якої зменшувалося на 156 % ($9,8 \text{ мН} \pm 1,17 \text{ мН}$) і вірогідно збільшувало розслаблювальний ефект відтікаючого від трабекули розчину на артерію на 52 % ($3,73 \text{ мН} \pm 0,45 \text{ мН}$, $P < 0,05$). Скорочувальні відповіді на контрольну електричну стимуляцію міокардіальної артерії смужки і трабекули в цій серії експериментів були майже вдвічі нижчими щодо значень у групі нетренованих тварин. Тобто в цих умовах протекторного впливу донора NO на міокард не відбувалося, що можна розцінювати як свідчення про вичерпання внутрішніх ресурсів міокарда під час гіпоксичного тренування старих тварин. Таким ресурсом

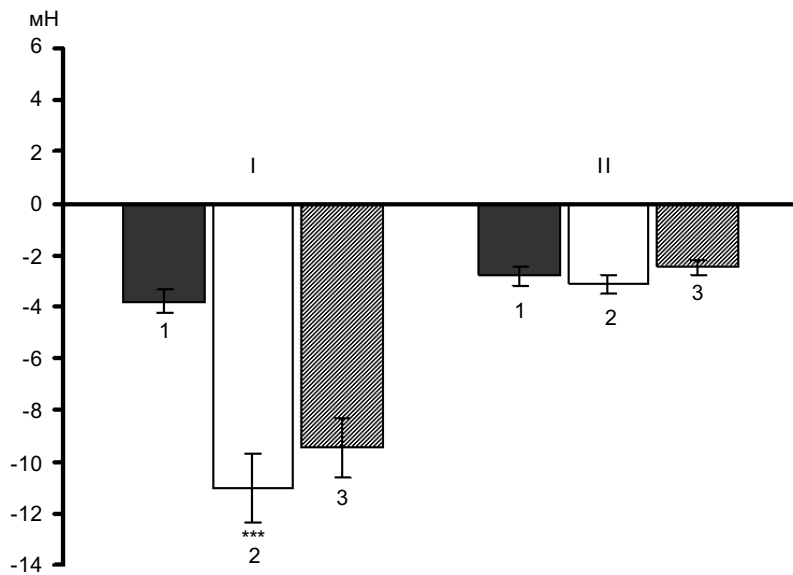


Рис. 2. Вплив реперфузії, інкубованої з феніларсиноксидом міокардіальної трабекули на тонічне напруження ізольованих препаратів контрольних тварин (1), старих тварин (2), старих тренуваних тварин (3). I – міокардіальна трабекула, II – артеріальна смужка (n=7).*** $P < 0,001$

може бути кількість тіолових груп у мембранних структурах клітин, яка зменшується з віком [2].

У наступній серії експериментів для оцінки ролі аденозину в процесі прекодиціювання міокарда, міокардіальну трабекулу інкубували в розчині Кребса–Хензеля з одночасним додаванням активатора МП ФАО і блокатора утворення аденозину (5' ізобутил-5'деоксі-аденозину, $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Реперфузія трабекули в цих

умовах призводила до зниження її тонічного напруження на $4,6 \text{ мН} \pm 0,55 \text{ мН}$, а артерії на $2,8 \text{ мН} \pm 0,4 \text{ мН}$, що відрізнялося, але не вірогідно, від результатів, які були отримані в контрольних дослідах. Водночас реакції ізольованих препаратів на тестову електричну стимуляцію в цих умовах якісно відрізнялися від контрольних. Тонічне напруження міокардіальної трабекули підвищувалося на $3,7 \text{ мН} \pm 0,46 \text{ мН}$, а артерії смужки на $2,8 \text{ мН} \pm 0,34 \text{ мН}$, що

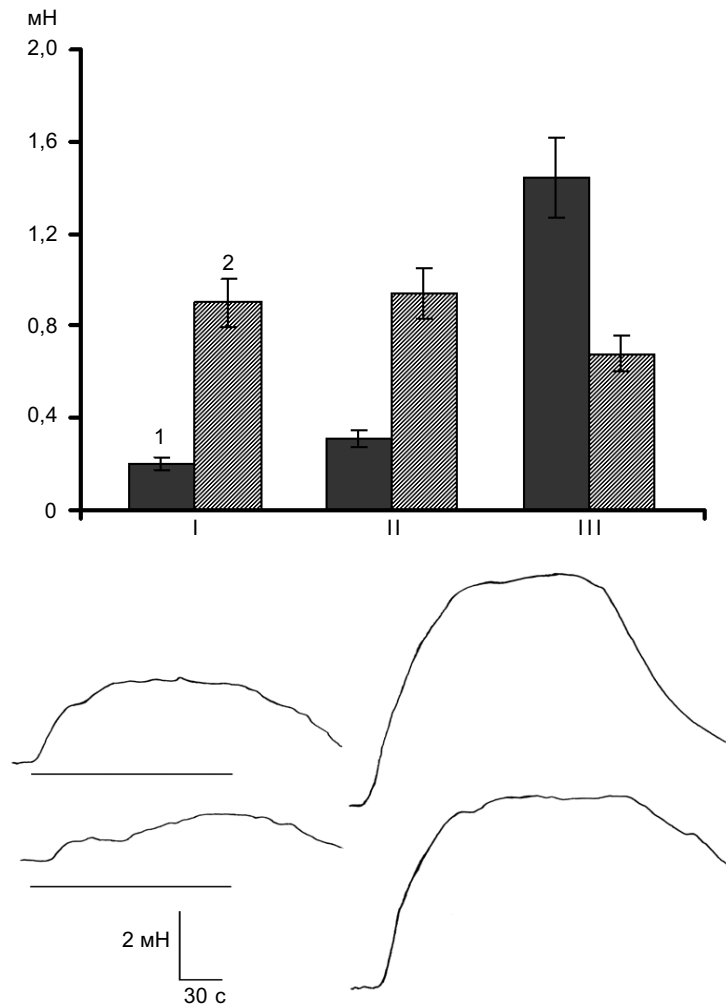


Рис. 3. Реакція ізольованих міокардіальних (1) та судинних (2) препаратів на тестову електричну стимуляцію після реперфузії інкубованої з феніларсиноксидом міокардіальної трабекули ($n=7$): I – контрольні тварини, II – старі тварини, III – старі треновані тварини.

Знизу представлено криві змін тонічного напруження ізольованих препаратів контрольних (зліва) та старих (справа) тварин у відповідь на електричну стимуляцію, які демонструють посилення скорочувальних реакцій у старих тварин

вірогідно вище ($P < 0,01$) від показників, зареєстрованих в умовах інкубації трабекули в розчині з ФАО. Але слід зазначити, що тонічне напруження обох препаратів підвищувалося майже однаково. Такий характер скорочувальних реакцій послідовно суперфузованих препаратів характерний для випадків пошкодження функції ендотелію/ендокарда ізольованого препарату-донора [6]. Окремо треба зазначити, що ізольовані препарати в цій серії дослідів втрачали здатність швидко розслаблюватися після припинення електричної стимуляції. За час перфузії між стимуляціями (20 хв) тонічне напруження ізольованих препаратів лишалося більшим від вихідного на 40–55 %.

Таким чином, оксидативний стрес мітохондріального походження впливає на розвиток порушень скорочувальної функції міокарда в умовах ішемії–реперфузії, що збігається з даними інших авторів [9, 12, 16]. Наведені результати прямо свідчать, що стабільний фактор, який вивільнюється із мітохондрій міокарда під час відкривання МП, може здійснювати паракринну регуля-

цію не тільки скорочувальної активності міокарда, а також гуморально зумовлені зміни тону судин, в нашому випадку артеріальної судини-донора, відповідно до ступеня ушкодження міокарда. Це можливо лише у разі наявності в складі МФ сполуки, яка вивільнює NO тільки в клітинному середовищі, яке містить специфічні ферменти, котрі забезпечують трансітрозолювання.

У наших дослідях показано, що ізольована міокардіальна трабекула старих тварин значно чутливіша до пошкоджувальної дії активатора МП ФАО, що свідчить про значне збільшення з віком чутливості МП кардіоміоцитів до дії чинників її відкривання. Як показано в останніх наукових публікаціях, гіпоксичне та ішемічне прекодиціювання здійснює стимулювальну дію на конститутивні ізоформи NO-синтаз у міокарді, в тому числі і на мітохондріальну [8, 13]. Це може бути одним із можливих механізмів наявності споріднених ефектів гіпоксичного прекодиціювання та попередньої перфузії з нітропрусидом натрію на ізольовані

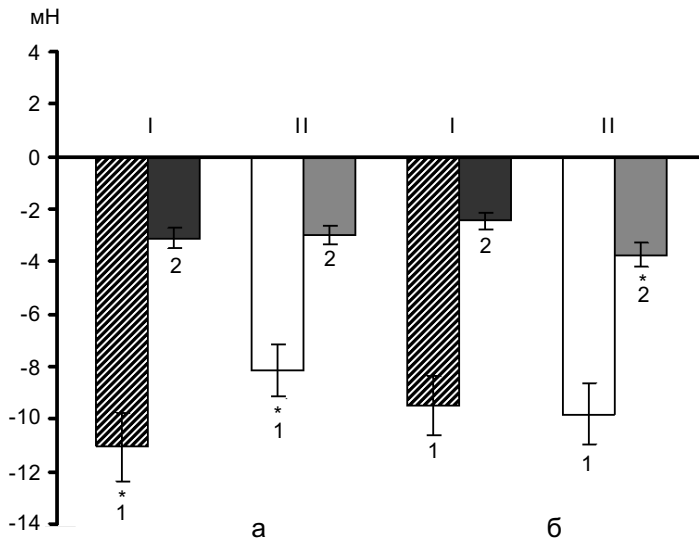


Рис. 4. Вплив попередньої перфузії з донором NO на зміни тонічного напруження ізольованих міокардіальних (1) та судинних (2) препаратів під час реперфузії інкубованої з феніларсиноксидом міокардіальної трабекули у старих (а) і старих тренуваних (б) тварин: I – зміни тонічного напруження ізольованих препаратів при реперфузії інкубованої з феніларсиноксиду міокардіальної трабекули, II – з донором NO. * $P < 0,05$

міокардіальні та судинні препарати. Згідно з нашими результатами, гіпоксичне preconditionування у старих тварин, так само як і у дорослих і протекторна дія донора NO у старих тварин позитивно впливає на функціональний стан міокарда та артеріальні судини внаслідок зменшення чутливості МП до дії її індукторів. Слід підкреслити, що гіпоксичне preconditionування чинило на міокардіальні та судинні препарати більш фізіологічну дію, ніж донор NO. В першому випадку відбувалося не лише відновлення скорочувальної активності ізольованих препаратів у відповідь на тестову електричну стимуляцію, але зареєстровано наявність модулювальної дії відтікаючого від міокардіальної трабекули розчину на тонус судинного препарату. Водночас попередня перфузія з нітропрусидом натрію ізольованих препаратів старих тварин, яких піддавали гіпоксичному тренуванню, не призводила до поліпшення скорочувальної функції ізольованих препаратів, що може бути свідченням вичерпання внутрішніх ресурсів міокарда. За даними біохімічних досліджень, кількість тіолів зменшується з віком, що знижує можливості клітини акумулювати та транспортувати оксид азоту [2], крім того нині є дані про пряме нітрозювання тіольних комплексів мітохондрій, яке модулює активність мітохондріального комплексу I [11].

Результати останніх серій дослідів показують, що блокада утворення аденозину якісно не змінювала характер реакцій ізольованих препаратів на активацію МП у міокардіальній трабекулі. Водночас відбувалося загальне підвищення тонічного напруження суперфузованих ізольованих препаратів та їх скорочувальних реакцій на тестову стимуляцію. На нашу думку, це свідчить про те, що аденозин необхідний для підтримання фізіологічно низького тону судин, але не відіграє провідної ролі в регуляції чутливості МП мітохондрій міокарда до дії її активаторів [17].

**A.V.Dmitrieva, Yu.A.Bubnova,
A.Yu.Boguslavsky, V.F.Sagach**

THE MODULATION OF MITOCHONDRIAL PORE SENSITIVITY OF ISOLATED MYOCARDIAL PREPARATIONS TO THE ACTION OF PORE ACTIVATORS

In the experiments with coperfused isolated ring strips from a carotis (A) and trabecule (T) from the right auricle of guinea pigs it has been shown the modification of a sensitivity of mitochondrial pore (MP) to the action of its activators. Exogenous NO-donor - sodium nitroprusside and hypoxic precondition (HP) caused a protective action on myocardium and arterial vessels isolated preparations of the old animals due to reducing of a myocardium MP sensitivity. While the contractile response to control electric stimulation T and A of the trained animals was almost twice lower in comparison to the group untraining ones, which can be evidence of the resources depleted of myocardium and vessels preparations caused by hypoxic training of the old animals.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Акопова О.В., Сагач В.Ф. Влияние доноров NO на аккумуляцию кальция в митохондриях миокарда и печени крыс // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, №2. – С.82–87.
2. Ванін А.Ф. Динитрозотиольные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биологических системах // Биохимия. – 1998. – 63, №7. – С.924–938.
3. Дмитрієва А.В., Сагач В.Ф., Богуславський А.Ю. Стабільний мітохондріальний фактор, який вивільнюється під час реперфузії: дослідження природи та впливу на міокард та судини. // Клін. та експерим. патологія. – 2004. – III. – №2 (1). – С.20–22.
4. Дмитрієва А.В., Сагач В.Ф., Богуславський А.Ю. Дослідження участі мітохондріальної пори в розвитку порушень скорочувальної активності міокарда та судин // Фізіол. журн. – 2005. – 51, №3. – С.18–24.
5. Дмитрієва А.В., Сагач В.Ф., Надточій С.Н., Богуславський А.Ю. Депрессорный фактор, освобождающийся из ишемизированного сердца, является NO-содержащей структурой. – В кн.: Пурины и монооксид азота. – Минск: Технопринт, 2003. – С.28–30.
6. Жукова А. В. Модулюючий вплив ендотеліального релаксуючого фактора на реактивність міокарда та артеріальних судинних смужок// Фізіол. журн. – 1999. – 45, № 1–2. – С. 64–72.
7. Сагач В.Ф., Богуславський А.Ю., Дмитрієва А.В., Надточій С.Н. Роль NO та мітохондріальної пори в

- регуляції кисневих режимів працюючого скелетного м'яза// Там само. – 2004. – **50**, №2. – С.19–26.
8. Bolli R., Bhatti Z.A., Tang X.L., Qiu Y.M. Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits triggered by the generation of nitric oxide// *Circulat.Res.* – 1997. – **81**, № 1. – P.42–52.
 9. Borutaite V., Jekabsone A., Morkuniene R., Brown G.C. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevent mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia// *J.Mol. Cell.Cardiol.* – 2003. – **35**. – P. 357–366.
 10. Borutaite V., Morkuniene R., Brown G.C. Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms// *FEBS Letters.* – 2000. – **467**. – P.155–159.
 11. Burwell L.S., Nadtochiy S.M., Tompkins A.J., Brooks P.S. Direct evidens for S-nitrosation of mitochondrial complex I//*Biochem.J.* – 2006. – **394**. – P.627–634.
 12. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death// *Biochem. J.* – 1999. – **341**. – P. 233–249.
 12. Hausenloy D.J., Yellon D.M., Duchon M.R. et al. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition // *Amer. J. Phisiol. Heart Circ. Phisiol.* – 2004. – **287**. – P.841–849.
 13. Korge P., Goldhaber J.I., Weiss J.N. Phenylarsine oxide induced mitochondrial permeability transition, hypercontracture, and cardiac cell death// *Amer. J. Phisiol.* – 2001. – **280**. – P.H2203–H2213.
 14. Murphy A. Mitochondria in human disease// *Biochemistry.* – 2000. – **4**. – P. 29–34.
 15. Sastre J., Pallardo F.V., Vina J. Mitochondrial oxidative stress play a key role in aging and apoptosis// *Life.* – 2000. – **49**. – P. 427–435.
 16. Piantadosi C., Tatro L., Whorton A. Nitric oxide and differential effects of ATP on mitochondrial permeability transition// *Nitric. Oxide.* – 2002. – **6**, №1. – P.45–46.
 17. Weiss J.N., Korge P., Honda H.M., Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease// *Circulat. Res.* – 2003. – **93**. – P. 292–301.