

Ю.В. Гошовська, Т.В.Шиманська, В.Ф. Сагач

## Вплив геніпіну – інгібітора UCP2 – на функцію серця старих щурів

*На моделі перфузованих за методом Лангендорфа серцях старих щурів (24 міс) вивчали вплив пригнічення активності білків-роз'єднувачів (UCP2) на зміни функціонального стану серця та кисневої вартості його роботи за умов ішемії (20 хв) та реперфузії (40 хв). Як інгібітор використовували геніпін, яким перфузували в дозах від  $10^{-9}$  до  $10^{-5}$  моль/л, а до ішемії – в дозі  $10^{-5}$  моль/л протягом 15 хв. Показано, що введення геніпіну в перфузійний розчин супроводжувалося пригніченням функціонального стану серця старих щурів, насамперед процесів розслаблення. Цей ефект носив дозозалежний характер. Аналогічна картина спостерігалася при введенні великих доз  $\text{CaCl}_2$ . Блокада активності UCP2 у старих щурів збільшувала реперфузійні порушення кардіодинаміки, скоротливої активності міокарда та його кисневого обміну. Дійшли висновку, що UCP2 беруть участь у регуляції кальцієвого гомеостазу, тому блокада їх активності супроводжується значними порушеннями функції серця.*

*Ключові слова: білки-роз'єднувачі UCP2, геніпін, ізольоване серце, старіння, ішемія-реперфузія, гомеостаз кальцію.*

### ВСТУП

Серед систем перетворення енергії в мітохондріях виділяють механізми, пов'язані з феноменом регульованого роз'єднання окиснення та фосфорилування під дією різних факторів зовнішнього середовища. В цих механізмах задіяні транспортні білки, яких відокремлюють в родину білків-роз'єднувачів (від англ. uncoupling proteins, UCPs). Незважаючи на інтенсивне вивчення термогеніну (UCP1), найвідомішого білка з цієї родини, функціональне значення його гомологів – UCP2/3, які експресуються в тканинах серця, залишається дискусійним. За даними літератури, UCP2/3 можуть брати участь у дисипації мембранного потенціалу, захисті від вільних радикалів, транспорті жирних кислот [2]. Останні роки широко обговорюються питання про їх роль у поглинанні та депонуванні іонів кальцію мітохондріями та причетності до кальціє-

вого уніпортеру [3, 6, 8, 10]. Класичними регуляторами активності білків-роз'єднувачів є жирні кислоти, продукти перекисного окиснення ліпідів (а саме 4-гідроксисоненон), супероксид [5] та пуринові нуклеотиди (АТФ, АДФ, ГТФ, ГДФ). Останні виступають їх інгібіторами. Вивчення фізіологічної ролі UCPs в умовах цілісного організму є складним з двох причин: по-перше, відсутність селективних блокаторів активності білків-роз'єднувачів, по-друге, відсутність адекватних методик для дослідів *in vivo*. Однак на ізольованих мітохондріях чи ліпосомах можна застосовувати такі регулятори UCPs, як жирні кислоти чи пуринові нуклеотиди, реєструвати мембранний потенціал мітохондрій і UCP-залежний протонний потік. Найчастіше при цьому використовується гуанідиндифосфат, але його застосування можливе тільки *in vitro* – на ізольованих мітохондріях, ліпосомах і реконститутованих системах, оскільки

© Ю.В. Гошовська, Т.В.Шиманська, В.Ф. Сагач

він не транспортується через цитоплазматичну мембрану.

Нещодавно було виявлено, що геніпін – компонент геніпозиду – сполуки, виділеної з екстракту плодів *Gardenia jasminoides* Ellis – інгібує UCP2-залежний протонний потік через внутрішню мембрану мітохондрій, збільшуючи мембранний потенціал і синтез АТФ [12]. Такі властивості геніпіну роблять його важливим інструментом вивчення функції білків-роз’єднувачів.

Нами було виявлено, що при старінні в міокарді збільшується експресія мРНК UCP2 та UCP3. Одночасно ми показали, що з віком зростає толерантність сердець щурів до ішемії [1]. Виникло питання, чи пов’язані між собою ці факти? Мета нашої роботи полягала у з’ясуванні фізіологічної ролі білків-роз’єднувачів у процесах підвищення стійкості міокарда старих щурів до ішемії–реперфузії, ми здійснювали блокаду UCP2 за допомогою геніпіну та вивчали його вплив на функціональний стан серця.

## МЕТОДИКА

Досліди проводили на самцях щурів лінії Вістар віком 24 міс. Серця вилучали розтином грудної клітки та швидко поміщали в охолоджений (4°C) розчин Кребса–Хензелайта. Перфузію коронарних судин здійснювали ретроградно в умовах постійного тиску (75–80 мм рт.ст.) при 37°C розчином такого складу (у ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO<sub>4</sub> – 1,2; NaHCO<sub>3</sub> – 24; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; глюкоза – 10; CaCl<sub>2</sub> – 2,5. Перфузійний розчин безперервно аерували карбогеном (95% O<sub>2</sub> і 5% CO<sub>2</sub>). Тиск у порожнині лівого шлуночка (P<sub>лш</sub>) та його першу похідну dP/dt<sub>max</sub> і dP/dt<sub>min</sub>, кінцевий діастолічний тиск (КДТ) вимірювали за допомогою латексного балончика, введеного в порожнину лівого шлуночка та з’єданого з тензодатчиком 746 („Мінгограф-82”, „Etema”, Швеція). Показники реєстрували на персональному комп’ютері

за допомогою програмного забезпечення Global Lab 2.0. Коронарний потік вимірювали як об’єм перфузійного розчину, що проходив через серце за хвилину.

Для розрахунку споживання кисню міокардом реєстрували напруга кисню у пробах розчину, що притікав і відтікав від серця, за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk-2 (“Radiometer”, Данія). Кисневу вартість роботи серця виражали як співвідношення споживання кисню до інтенсивності скорочувальної функції серця (добуток тиску, який розвивав лівий шлуночок, на частоту серцевих скорочень).

Послідовну перфузію сердець геніпіном (“Wako Inc.”, США) у концентраціях з 10<sup>-9</sup> до 10<sup>-5</sup> моль/л проводили протягом 15 хв кожну.

Моделювання ішемії–реперфузії здійснювали за допомогою повного припинення перфузії коронарних судин протягом 20 хв. Під час ішемії температуру сердець підтримували зануренням їх у перфузійний розчин (37°C). Зміни досліджуваних показників реєстрували протягом 40 хв після відновлення перфузії. Геніпін у дозі 10<sup>-5</sup> моль/л вводили протягом 15 хв перед ішемією.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel з використанням методу різниць. Всі результати виражалися у вигляді середнього ± стандартне відхилення. Достовірність змін показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Перфузія сердець старих тварин блокатором UCP2 геніпіном у дозі 10<sup>-5</sup> моль/л уже через 5–10 хв призводила до певного пригнічення функціонального стану серця (рис. 1). Особливо слід виділити зниження коронарного потоку (з 17,6±1,7 до 16,0 мл/хв ± 1,4 мл/хв, P<0,05) та ЧСС (з 241,0±5,8 до 211,0 хв<sup>-1</sup> ± 13,3 хв<sup>-1</sup>, P<0,05) на 15-й

хвилині перфузії, а також збільшення кисневої вартості роботи міокарда вже на 5-й хвилині після введення в перфузійний

розчин геніпіну (на 30 %,  $P < 0,05$ ). Ступінь реперфузійних порушень функції серця з попередньою блокадою UCP2 був значно

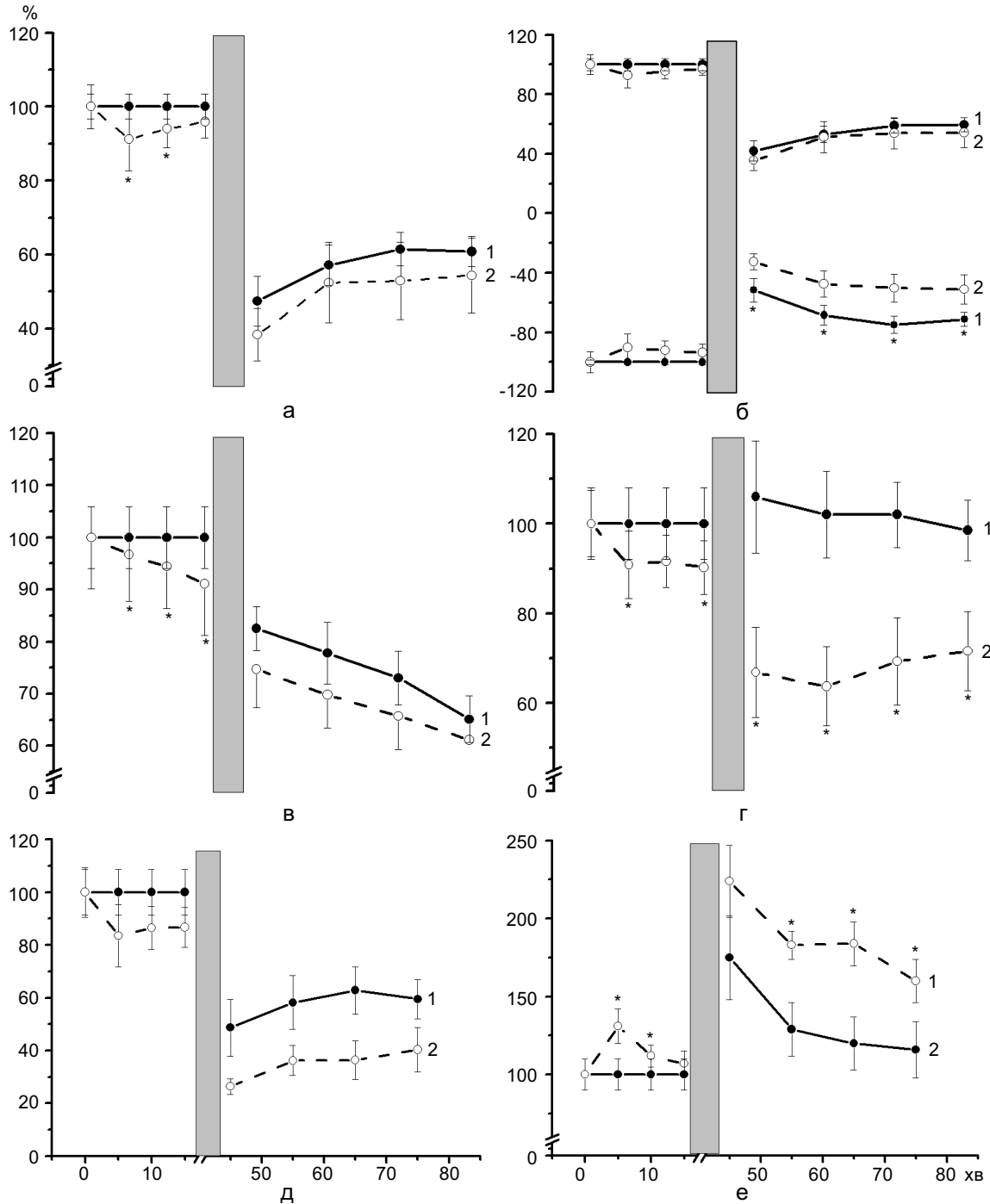


Рис. 1. Вплив геніпіну на показники кардіодинаміки та кисневого обміну міокарда при ішемії–реперфузії серця старих щурів: 1 – ішемія–реперфузія (контроль), 2 – ішемія–реперфузія на тлі дії геніпіну; а – тиск, що розвивав лівий шлуночок; б – швидкість скорочення та розслаблення міокарда (dP/dt); в – коронарний потік; г – частота серцевих скорочень; д – інтенсивність скоротливої функції, е – киснева вартість роботи серця. \*  $P < 0,05$

вищий порівняно з контрольною серією (рис. 1). В першу чергу пригнічувалися процеси розслаблення міокарда. Підвищення КДТ у процесі ішемії реєстрували в середньому на 2,4 хв раніше та з більшою амплітудою, ніж у серії без геніпіну, а на 10-й хвилині реперфузії підвищення КДТ у 1,8 раза перевищувало такий приріст у контрольній серії. Підтвердженням була динаміка відновлення  $dP/dt_{\min}$  – на тлі блокади УСР2 на 40-й хвилині реперфузії цей показник становив  $1311 \pm 250$  (54 %) порівняно з  $2404$  мм рт.ст./с  $\pm 153$  мм рт.ст./с до ішемії, а в контрольній серії –  $1409 \pm 97$  (71 %) і  $1979$  мм рт.ст./с  $\pm 32$  мм рт.ст./с відповідно. Важливо відзначити істотне зниження ЧСС протягом усієї реперфузії ( $P < 0,05$ ), зміни якої зовсім не спостерігали в контрольній серії. В результаті під час реперфузії достовірно зменшувалась інтенсивність скорочувальної функції, а киснева вартість роботи серця збільшувалась. Отже, геніпін істотно пригнічував процеси відновлення функціонального

стану серця старих щурів після впливу ішемії порівняно з контрольною серією.

Для з'ясування впливу менших доз геніпін вводили в перфузійний розчин, поступово збільшуючи дозу з  $10^{-9}$  до  $10^{-5}$  моль/л. Тривалість перфузії кожної з концентрацій становила 15 хв. Виявилось, що в дозі  $10^{-9}$  моль/л геніпін вже проявляє кардіодепресорний вплив (рис. 2), що характеризується зниженням  $P_{\text{лш}}$  і швидкості скорочення  $dP/dt_{\max}$  та розслаблення  $dP/dt_{\min}$  міокарда, збільшенням КТД. Найпоказовішим було зменшення коронарного потоку, яке спостерігалось вже на 5-й хвилині перфузії геніпіном у дозі  $10^{-9}$  моль/л і невпинно тривало до кінця експерименту. Сукупність наведених результатів свідчить про можливість перевантаження клітин серця іонами кальцію і/або утруднене їх відкачування з цитоплазми в кальцієві депо. Існують свідчення можливої участі УСР2 у кальцієвому гомеостазі [10]. Повільно наростаюча контрактура коронарних судин, яку ми спостерігали в наших

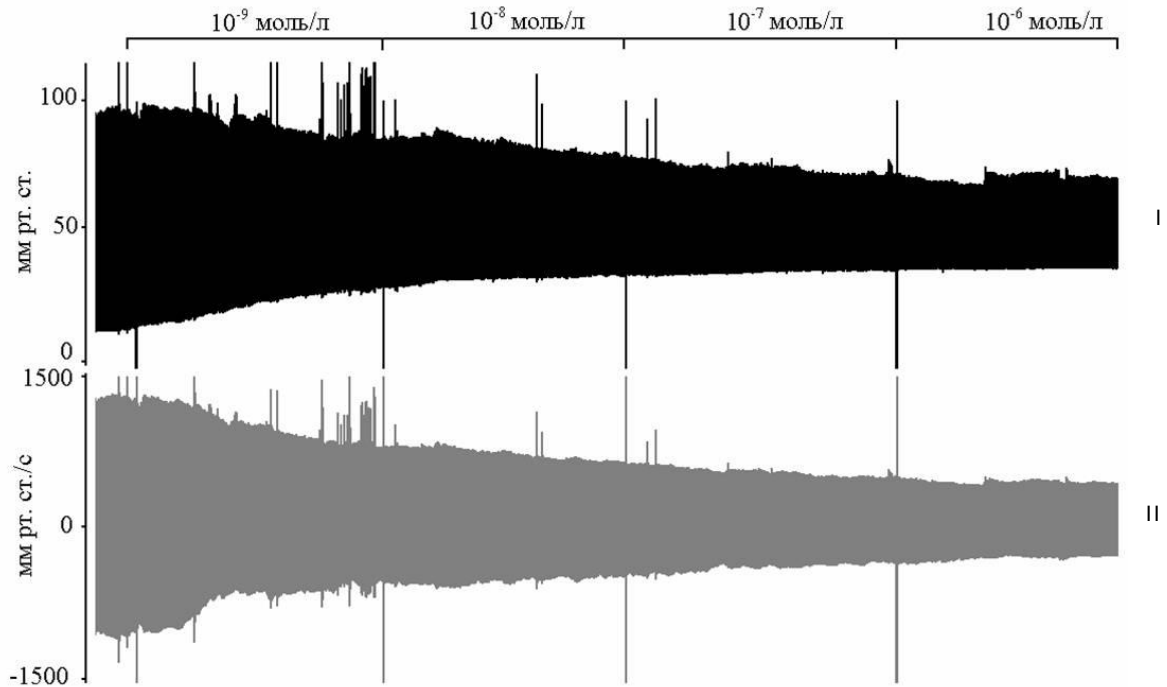


Рис. 2. Вплив перфузії геніпіном на кардіодинаміку сердець старих щурів: I – тиск, що розвивав лівий шлуночок, II – швидкість скорочення та розслаблення міокарда ( $dP/dt$ )

дослідах, може опосередковано підтверджувати цю гіпотезу. Схожа реакція відбувалася при збільшенні концентрацій  $\text{CaCl}_2$  в перфузуючому розчині з 1,7 до 15 ммоль/л. У дозі 10–12,5 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  здійснював кардіодепресорний вплив (рис. 3). За цих умов значно погіршувалося розслаблення міокарда, різко підвищувався КДТ і знижувався коронарний потік як за дії геніпіну. Отже, можна припустити, що геніпін впливає на скоротливий апарат кардіоміоцитів за допомогою блокади процесів відкачування іонів кальцію у клітинні депо.

В енергетичному комплексі мітохондрій білки-роз'єднувачі, ймовірно, виступають оптимізаторами продукції АТФ. Згідно з нашими попередніми дослідженнями, в тканинах серця щурів з віком збільшується експресія генів білків-роз'єднувачів [1]. Ми вважаємо, що цей процес у старих тварин має протекторний характер, оскільки застосування блокатора UCP2 пригнічувало функцію серця, а реперфузійні порушення функції міокарда на тлі попереднього введення геніпіну були більш істотними, ніж

у контрольній серії. Геніпін є структурно кінцевим метаболітом геніпозидів і має рослинне походження [7], тому ми припустили можливим використання його в експериментах *in situ* для з'ясування впливу блокади UCP2 на роботу серця. Залишається невідомим механізм дії цього інгібітора, оскільки геніпін не функціонує як скавенджер [9], хоча його з успіхом використовують при лікуванні діабету [11], який, як і ішемія–реперфузія, характеризується глибоким окисним стресом. Є свідчення важливої ролі UCP2 в засвоєнні глюкози клітинами жирової тканини [4]. Використання геніпіну як блокатора UCP2 призводило до зменшення поглинання глюкози адипоцитами, в той час як мітохондріальний роз'єднувач FCCP повністю відновлював цей процес [13]. В експериментах на мітохондріях UCP2-нокаутних тварин доведено, що геніпін інгібує UCP2-залежний протонний потік і не є при цьому скавенджером супероксиду, оскільки він не знижує вміст супероксиду в системі ксантин – ксантинооксидаза, в той час як

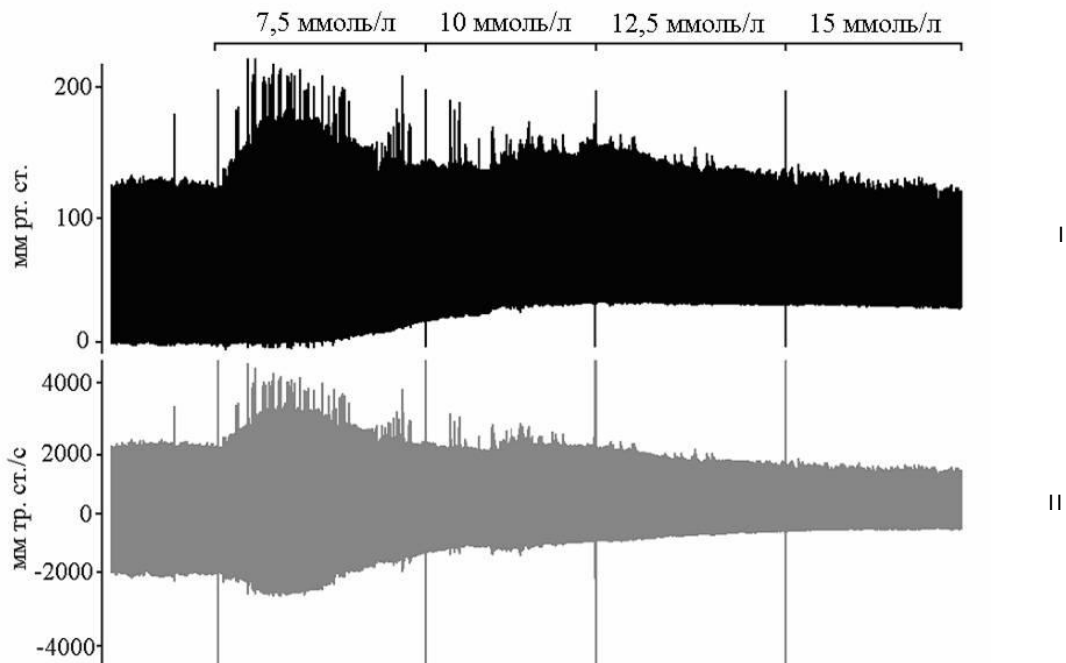


Рис. 3. Зміни кардіодинаміки серця щурів при підвищенні концентрації  $\text{CaCl}_2$  в перфузійному розчині: I – тиск, що розвивав лівий шлуночок, II – швидкість скорочення та розслаблення міокарда ( $dP/dt$ )

додавання супероксиддисмутази повністю редукує його кількість [12]. Найімовірніше, геніпін безпосередньо пригнічує активність UCPs. Як стверджують автори, він не впливає на роботу аденіннуклеотидтранслокази і, як наслідок, на стани 3 та 4 мітохондрій. Таким чином, пригнічення UCP2-залежного протонного потоку призводить до збільшення мембранного потенціалу, що передбачає стимуляцію роботи АТФ-синтази, збільшення вмісту АТФ. За цих умов скорочувальна активність серця повинна підвищуватися, чого ми не спостерігали у своїх експериментах. Однак існує думка, що білкам-роз'єднувачам властива функція регуляції кальцієвого гомеостазу [10], яка є дискусійною [3]. В наших дослідах ми зіткнулися з кардіодепресорним ефектом перфузії геніпіном, що проявлявся в зниженні  $P_{\text{лш}}$ , коронарного потоку, а також підвищенні КДТ. Останній факт, як і зменшення  $dP/dt_{\text{min}}$ , вказує на погіршення процесів розслаблення міокарда та є опосередкованим показником перевантаження кардіоміоцитів іонами кальцію і можливої дисфункції кальцієвих насосів. Крива змін тиску у лівому шлуночку та скорочувальної активності міокарда при застосуванні великих ( $10,0$  ммоль/л) доз  $\text{CaCl}_2$  в наших експериментах була подібною до аналогічної кривої перфузії геніпіном. Отже, ми припускаємо, що білки-роз'єднувачі беруть участь у регуляції гомеостазу кальцію, відповідно їх інгібування супроводжується істотними порушеннями функції серця.

Таким чином, результати експериментів свідчать, що блокада UCP2 геніпіном пригнічувала функціональний стан серця старих щурів і погіршувала процеси відновлення роботи серця на реперфузії.

## ВИСНОВКИ

1. Пригнічення активності UCP2 геніпіном у дозі від  $10^{-9}$  до  $10^{-5}$  моль/л супровод-

жувалося зниженням  $P_{\text{лш}}$ , скорочувальної активності та коронарного потоку у серці старих щурів. Ефект мав дозозалежний характер.

2. Попередня перфузія геніпіном у дозі  $10^{-5}$  моль/л протягом 15 хв до ішемії збільшувала реперфузійні порушення функції серця старих щурів порівняно з контрольною серією.

**Ю.В. Гошовская, Т.В. Шиманская, В.Ф. Сагач**

## ВЛИЯНИЕ ГЕНИПИНА – ИНГИБИТОРА UCP2 – НА ФУНКЦИЮ СЕРДЦА СТАРЫХ КРЫС

В экспериментах на изолированных сердцах старых (24 мес) крыс, перфузируемых по методу Лангендорфа, изучали влияние блокады активности белков-разобщителей (UCP2) на изменения функционального состояния сердца и кислородную стоимость его работы в контрольных условиях и при ишемии-реперфузии (20 мин/40 мин). В качестве ингибитора использовали генипин, который перфузировали в нарастающих дозах от  $10^{-9}$  до  $10^{-5}$  моль/л, а перед ишемией на протяжении 15 мин в дозе  $10^{-5}$  моль/л. Показано, что введение генипина в перфузионный раствор сопровождалось угнетением функционального состояния сердца старых крыс, что в первую очередь сказывалось на процессах расслабления миокарда. Эффект носил дозозависимый характер. Аналогичная картина наблюдалась при введении больших доз  $\text{CaCl}_2$ . Блокада активности UCP2 увеличивала реперфузионные нарушения кардиодинамики, сократительной активности миокарда и его кислородного обмена у старых крыс. Сделан вывод, что UCP2 принимают участие в регуляции кальциевого гомеостаза, поэтому блокада активности белков-разобщителей сопровождается глубокими нарушениями функции сердца.

Ключевые слова: белки-разобщители UCP2, генипин, изолированное сердце, старение, ишемия – реперфузия, гомеостаз кальция

**Y.V. Goshovska, T.V. Shimanskaya, V.F. Sagach**

## EFFECT OF UCP2 ACTIVITY INHIBITOR GENIPIN ON HEART FUNCTION OF AGING RATS

To estimate the role of uncoupling proteins in aging rat heart recovery from prolonged ischemia we used genipin application during Langendorf preparation. It was shown that genipin in dose-dependent manner depressed coronary flow, heart rate and cardiac diastolic function. Such effect was similar to that observed during myocardial  $\text{Ca}^{2+}$  overload by gradually elevated  $\text{CaCl}_2$  in perfusion solution. Moreover, postischemic

disturbances of cardiodynamic parameters, oxygen cost of myocardial work were much increased in genipin pretreated hearts that in control ones. Thus, genipin inhibition of UCP2 activity has cardiodepressive effects that imply UCPs in cardiac calcium regulation.

Key words: uncoupling proteins UCP2, isolated heart, aging, ischemia reperfusion, calcium homeostasis.

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гошовська Ю.В., Лісовий О.О., Шиманська Т.В., Сагач В.Ф. Зміни експресії генів UCP2 та UCP3, функціонального стану і кисневої вартості роботи міокарда в умовах старіння та ішемії–реперфузії // Фізіол. журн. – 2009. – **55**, №3. – С. 26–36.
2. Brand M.D., Esteves T.C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3 // *Cell Metabol.* – 2005. – **2**. – P. 85–93.
3. Brookes P.S., Parker N., Buckingham J.A. et al. UCPs – unlikely calcium porters // *Nat. Cell Biol.* – 2008. – **10**, № 11. – P. 1235–1237.
4. Chan C.B., De Leo D., Joseph J.W. et al. Increased uncoupling protein-2 levels in  $\beta$ -cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action // *Diabetes.* – 2001. – **50**. – P. 1302–1310.
5. Echtay K.S., Roussel D., St Pierre et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins // *Nature.* – 2002. – № 415. – P. 96–99.
6. Graier W.F., Frieden M., Malli R. Mitochondria and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling: old guests, new functions // *Pflug. Arch. – Eur. J. Phys.* – 2007. – № 455. – P. 375–396.
7. Koo H-J., Lim K-H., Jung H-J., Park E-H. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin // *J. Ethnopharmacol.* – 2006. – **103**. – P. 496–500.
8. Malli R., Frieden M., Trenker M., Graier W.F. The role of mitochondria for  $\text{Ca}^{2+}$  refilling of the ER // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**. – P. 12114–12122.
9. Park K.S., Kim B.H., Chang H-M. Inhibitory potencies of several iridoids on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 enzymes activities, tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production in vitro // *Evid. Based Complement. Altern. Med.* – 2007. – **129**. – P. 1–5.
10. Trenker M., Malli R., Fertschai I. et al. Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for  $\text{Ca}^{2+}$  uniport // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – **8**, № 4. – P. 445–452.
11. Wu S.Y., Wang G.F., Liu Z.Q. et al. Effect of geniposide, a hypoglycemic glucoside, on hepatic regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2009. – **30**, №2. – P. 202–208.
12. Zhang Ch.-Yu., Parton L.E., Ye Ch. P. et al. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced  $\beta$ -cell dysfunction in isolated pancreatic islets // *Cell Metabol.* – 2006. – **3**. – P. 417–426.
13. Zhou H., Zhao J., Zhang X. Inhibition of uncoupling protein 2 by genipin reduces insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2009. – **486**. – №1. – P. 88–93.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*  
*E-mail: pokutt@gmail.com*

*Матеріал надійшов до редакції 03.09.2009*