

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

Роль оксиду азоту у розвитку скоротливих реакцій міокарда тренуваних тварин

Оксид азоту синтезується в значних кількостях у тренуваних тварин. Він покращує як процеси вазодилатації, так скоротливу та насосну функцію серця. Залишається нез'ясованим його вплив на реакції серця у відповідь на навантаження об'ємом і кальцієм, що спостерігається при тривалих фізичних навантаженнях. В експериментах на ізольованому за методом Лангендорфа серці щурів покращувався функціональний стан серця як наслідок адаптації протягом 4 тиж до навантаження плаванням, що проявлялось у збільшенні скоротливої активності міокарда на 20 % і коронарного потоку (з $12,0 \pm 0,8$ до $16,0 \text{ мл/хв} \pm 1,5 \text{ мл/хв}$), зменшенні частоти серцевих скорочень, а також збільшенні функціональних резервів серця. При однаковому розтягуванні лівого шлуночка серця тренуваних щурів відповідали більш потужною силою скорочення. Вперше встановлено, що мембранний потенціал мітохондрій серця тренуваних щурів був достовірно вищий, ніж у контрольних тварин ($-176,5 \pm 8,4$ та $-156 \text{ мВ} \pm 3,5 \text{ мВ}$ відповідно), що свідчить про збільшення спряження окисного фосфорилування. Курс тренування плаванням запобігав швидкому росту кінцево-діастолічного тиску та появі аритмій при відтворенні моделі кальцієвого перевантаження (CaCl_2 від 1,7 до 12,5 ммоль/л). У тренуваних тварин відмічали відкриття мітохондріальних пор при більш високих концентраціях кальцію у перфузійному розчині. Показано, що адаптація до фізичного навантаження та збільшення резервів серця зумовлені впливом оксиду азоту, блокада синтезу якого за допомогою L-NAME (10^{-4} моль/л) усувала вказані адаптаційні зміни.

Ключові слова: оксид азоту, ізольоване серце, фізичне тренування плаванням, крива Франка–Старлінга, перевантаження кальцієм.

ВСТУП

Тренованість, що розвивається внаслідок регулярних фізичних навантажень, передбачає складний комплекс перебудови всіх систем організму і забезпечує можливість виконання інтенсивної фізичної роботи протягом тривалого часу. Така перебудова стосується насамперед серцево-судинної системи і спрямована на посилення кровопостачання працюючих м'язів, в яких спостерігається збільшення кровотоку в декілька разів. Останнє в свою чергу забезпечується значним зростанням насосної та скоротливої функції серця, а також вазодилатацією судин скелетних м'язів. Робоча гіперемія, як відомо, пов'язана зі збільшенням синтезу оксиду азоту в ендоте-

ліальних клітинах судин [31, 36], про що свідчить значне підвищення активності NO-синтази (NOS) в скелетних м'язах [30, 36] і судинах тренуваних тварин [1]. Синтез оксиду азоту у таких тварин відбувається не тільки внаслідок посилення активності NOS, а також і експресії різних ізоформ NO-синтаз [37].

Підвищений синтез оксиду азоту впливає і на скоротливу активність кардіоміоцитів [18]. Покращення функціонального стану міокарда у тренуваних організмів значною мірою забезпечується саме змінами на клітинному рівні, які супроводжуються збільшенням сили та швидкості скорочень кардіоміоцитів. Останнє зумовлено прискоренням кальцієвих транзєнтів та підвищенням чутливості міофіламентів

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

до іонів кальцію [22, 34]. Однак збільшення скоротливої активності міокарда у тренуваних організмів можливе лише за умов його енергетичного забезпечення. Така збільшена потреба клітин міокарда в енергії вирішується як внаслідок стимуляції розмноження мітохондрій [29], так і більш ефективного синтезу аденозинтрифосфату (АТФ). Вказані зміни функції мітохондрій в основному зумовлені здатністю того ж оксиду азоту, що синтезується в клітинах міокарда, пригнічувати відкривання мітохондріальних пор [7, 14, 15, 32] і покращувати функцію мітохондрій. Посилення скоротливої і насосної функції серця при фізичних навантаженнях також залежить від механізмів, що забезпечують збільшення серцевого викиду при зростанні притоку крові до серця. Попередні дані свідчать про можливу роль у цій реакції оксиду азоту [28].

Мета роботи полягала у з'ясуванні ролі оксиду азоту у розвитку скоротливих реакцій міокарда тренуваних тварин.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції щодо роботи з експериментальними тваринами (Страсбург, 1986). Тренування щурів відбувалося у резервуарі з водою при 30–32 °С протягом 4 тиж за схемою, що детально описана раніше [5]. Вивчали резервні можливості та зміни показників скоротливої активності і кисневого обміну міокарда, вивільнення у коронарний потік мітохондріального фактора при дії зростаючих концентрацій CaCl_2 у щурів у контрольних умовах і після дозованого фізичного навантаження плаванням на тлі блокади синтезу оксиду азоту і без неї.

Експерименти виконували на ізольованих серцях самців щурів лінії Вістар масою 300–350 г. Перфузію коронарних судин здійснювали ретроградно (за методом Лангендорфа) в умовах постійного

тиску (75–80 мм рт. ст.) при 37 °С розчином Кребса–Хензелята такого складу (ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO_4 – 1,2; NaHCO_3 – 24; KH_2PO_4 – 1,2; глюкоза – 10; CaCl_2 – 1,7. Перфузійний розчин безперервно аерували карбогеном (95 % O_2 і 5 % CO_2). Тиск у порожнині лівого шлуночка ($P_{\text{лш}}$) та його першу похідну dP/dt_{max} і dP/dt_{min} , кінцевий діастолічний тиск (КДТ) вимірювали за допомогою латексного балончика тензодатчиком 746 („Мінгограф-82”, „Elema”, Швеція) і реєстрували на комп'ютері за допомогою програмного забезпечення Global Lab. Значення коронарного потоку оцінювали як об'єм перфузійного розчину, який відтікав від серця за 1 хв.

Для виявлення функціональних резервів міокарда проводили дозоване додаткове розтягування балончика з кроком 34 мкл і будували криву Франка–Старлінга у контрольних і тренуваних щурів.

Щоб оцінити чутливість мітохондріальних пор до відкривання, в експериментах *in situ* відтворювали модель кальцієвого навантаження. У перфузійний розчин кожні 15 хв додавали CaCl_2 , концентрація якого протягом експерименту послідовно збільшувалася від 1,7 до 15 ммоль/л. У пробах розчину, який відтікав від серця кожні 15 хв, реєстрували мітохондріальний фактор [4]. Оптичну густину проб вимірювали в ультрафіолетовому спектрі в діапазоні хвиль 230–260 нм за допомогою спектрофотометра СФ-46.

Для розрахунку споживання кисню міокардом за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk-2 («Radiometer», Данія) реєстрували напруження кисню у пробах розчину, що притікав і відтікав від серця. Кисневу вартість роботи серця виражали як співвідношення споживання кисню до інтенсивності скоротливої функції серця (ІСФ – добуток $P_{\text{лш}}$ та частоти серцевих скорочень).

Синтез NO блокували L-NAME (N (G)-нітро-L-аргінін метил естер гідрохлорид, «Sigma») у дозі 10^{-4} моль/л, яким перфузували серця протягом 15 хв.

Виділення мітохондрій з тканин серця здійснювали за допомогою методу диференційного ультрацентрифугування [2]. Серця ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином КСl (2–4 °С), подрібнювали та гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСl – 25, ЕДТА – 1; рН 7,2–7,4. Гомогенат центрифугували при 700 g 8 хв (4 °С), супернатант – повторно при 11000 g 16 хв (4 °С). Отриманий осад (мітохондріальна фракція) суспендували в буфері (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСl – 25; рН 7,2–7,4 і одразу використовували в дослідах. Концентрацію білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі.

Вимірювання мембранного потенціалу у суспензії мітохондрій здійснювали методом, запропонованим Брандом [13, 27]. Мітохондрії інкубували в середовищі, що містило 120 ммоль/л КСl, 25 ммоль/л тріс-НСl, 3 ммоль/л $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_4\text{O}_7$, 5 % знежиреного бичачого сироваткового альбуміну; рН 7,2–7,4. У герметичну термостатовану камеру (37°С), обладнану ТРМР⁺-селективним електродом (трифенілметилфосфоній) вносили мітохондрії з розрахунку 0,5 мг/мл білка. Роботу першого комплексу дихального ланцюга блокували ротеноном ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/л), а роботу АТФ-синтази – олігоміцином (10^{-7} моль/л). Для ініціації дихання вносили сукцинат Na (5 ммоль/л). Поглинання кисню суспензією мітохондрій реєстрували за допомогою електрода Кларка та

газоаналізатора BMS 3 Mk-2 («Radiometer», Данія).

Мембранний потенціал мітохондрій ($\Delta\psi_m$) розраховували за рівнянням Нернста, приймаючи значення внутрішнього об'єму мітохондрій за 0,65 мкл/мг білка [11].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Origin 6.1 з використанням методу різниць. Всі результати виражали у вигляді середнього \pm стандартне відхилення. Достовірність змін показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Навантаження щурів плаванням протягом 4 тиж поліпшувало функціональний стан їхнього серця (таблиця): істотно (на третину) збільшувався коронарний потік, підвищувалася скоротлива активність міокарда, достовірно зменшувалася частота серцевих скорочень.

При посиленій м'язовій роботі інотропні впливи на серце, що зумовлені ефектом Франка–Старлінга, відіграють провідну роль у інтенсифікації серцевої діяльності. Скорочення скелетних м'язів викликає періодичне стискання вен кінцівок, що призводить до збільшення венозного притоку внаслідок мобілізації резерву депонованої в них крові. В наших експериментах при додатковому розтягуванні лівого шлуночка серця тренуваних плаван-

Вплив тренування плаванням на показники функціонального стану серця щурів (M \pm m)

Показник	Контроль	Фізичне навантаження	Фізичне навантаження та введення L-NAME
Тиск, що розвивається у лівому шлуночку, мм рт.ст.	85,4 \pm 8,5	96,0 \pm 3,8	83,0 \pm 4,3
Кінцево-діастолічний тиск, мм рт.ст.	0,38 \pm 1,73	3,46 \pm 1,53	0,14 \pm 0,91
Швидкість скорочення міокарда, мм рт.ст./с	1559 \pm 127	1875 \pm 58*	1484 \pm 124 **
Швидкість розслаблення міокарда, мм рт.ст./с	1537 \pm 118	1895 \pm 103*	1520 \pm 140 **
Коронарний потік, мл/хв	12,0 \pm 0,8	16,0 \pm 1,5 *	10,3 \pm 1,0 **
Частота серцевих скорочень, хв ⁻¹	217 \pm 11	183 \pm 10 *	220 \pm 10 **

* P < 0,05 відносно значення в контрольній групі; ** P < 0,05 відносно значення у групі тварин після курсу фізичних тренувань.

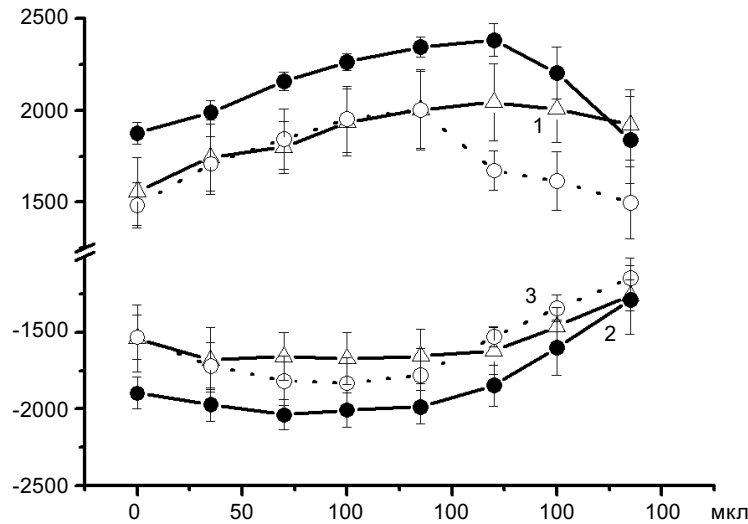


Рис. 1. Зміни скоротливої активності міокарда ($\pm dP/dt$) при дозованому збільшенні об'єму лівого шлуночка: 1 – контроль, 2 – треновані щури, 3 – треновані щури і введення L-NAME

ням щурів відповідали більш потужною силою скорочень і мали високу здатність до розслаблення в період діастолі. Це свідчило про великий функціональний потенціал сердець тренованих тварин, що, ймовірно, зумовлюється оптимізацією процесів регуляції обміну в міокарді (рис. 1).

Таким чином, тренування щурів плаванням протягом 4 тиж позитивно впливало на показники кардіодинаміки, що супроводжувалося підвищенням скоротливої активності серця, коронарного потоку та збільшенням його функціональних резервів.

Потужна робота серця потребує великих енергетичних витрат. Для порівняння ефективності роботи дихального ланцюга у контрольних і тренованих тварин реєстрували рівень мембранного потенціалу та поглинання кисню у суспензії мітохондрій серця. Встановлено, що в умовах блокади АТФ-синтази та максимальної швидкості дихання мембранний потенціал у суспензії мітохондрій серця тренованих щурів становив $-176,5 \text{ мВ} \pm 8,4 \text{ мВ}$ і був достовірно вищим, ніж у суспензії мітохондрій, ізольованих із сердець контрольних тварин ($\Delta\psi_m = -156,5 \text{ мВ} \pm 3,5 \text{ мВ}$, $P < 0,05$; рис. 2). Аналогічний характер змін мембранного потенціалу спостерігали при дослідженні

суспензії мітохондрій печінки: $\Delta\psi_m = -172,0 \pm 7,0 \text{ мВ}$ щодо $-150,0 \text{ мВ} \pm 7,4 \text{ мВ}$ у контролі, $P < 0,05$. Таким чином, навантаження щурів плаванням протягом 4 тиж мало системний адаптаційний ефект.

Підвищений порівняно з контрольним мембранний потенціал у мітохондріях серця тренованих плаванням щурів свідчив про ефективне функціонування дихального ланцюга, підвищене спряження окисного

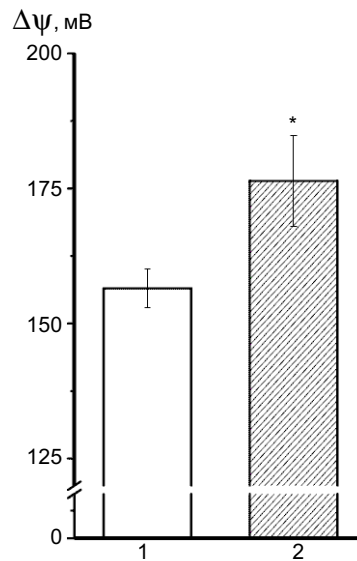


Рис. 2. Значення мембранного потенціалу у суспензії мітохондрій серця щурів без (1) та після курсу фізичного навантаження плаванням (2)

фосфорилування і, відповідно, високий рівень синтезу АТФ. Останнє, очевидно, забезпечувало продуктивну роботу серця тренуваних тварин. Відомо, що мембранний потенціал безпосередньо залежить від ступеня протонної провідності мітохондріальних мембран. Зареєстроване нами високе значення мембранного потенціалу у щурів після фізичного навантаження свідчило, що витік протонів, який спостерігається при утворенні мітохондріальних пор і дії роз'єднувальних білків, мінімізований.

Для виявлення адаптаційних можливостей міокарда та його чутливості до утворення мітохондріальних пор відтворювали модель кальцієвого перевантаження міокарда – послідовно збільшували концентрацію CaCl_2 у розчині, яким перфузували

ізолюване серце. Через 15 хв після підвищення дози Ca^{2+} брали проби розчину, що відтікав від серця, для вимірювання його оптичної густини і виявлення мітохондріального фактора. Вивільнення останнього було показником порушення проникності мітохондріальних мембран [4].

Встановлено, що курс тренування плаванням запобігав швидкому підвищенню КДТ та появі аритмій при відтворенні моделі кальцієвого перевантаження. При однаковій концентрації Ca^{2+} у перфузійному розчині серця тренуваних щурів розвивали більш потужну реакцію, яка проявлялась у підвищенні $P_{\text{лш}}$, скорочувальної активності, коронарного потоку та інтенсивності роботи міокарда (рис. 3). Слід відмітити, що максимальна інотропна стимуляція серця у

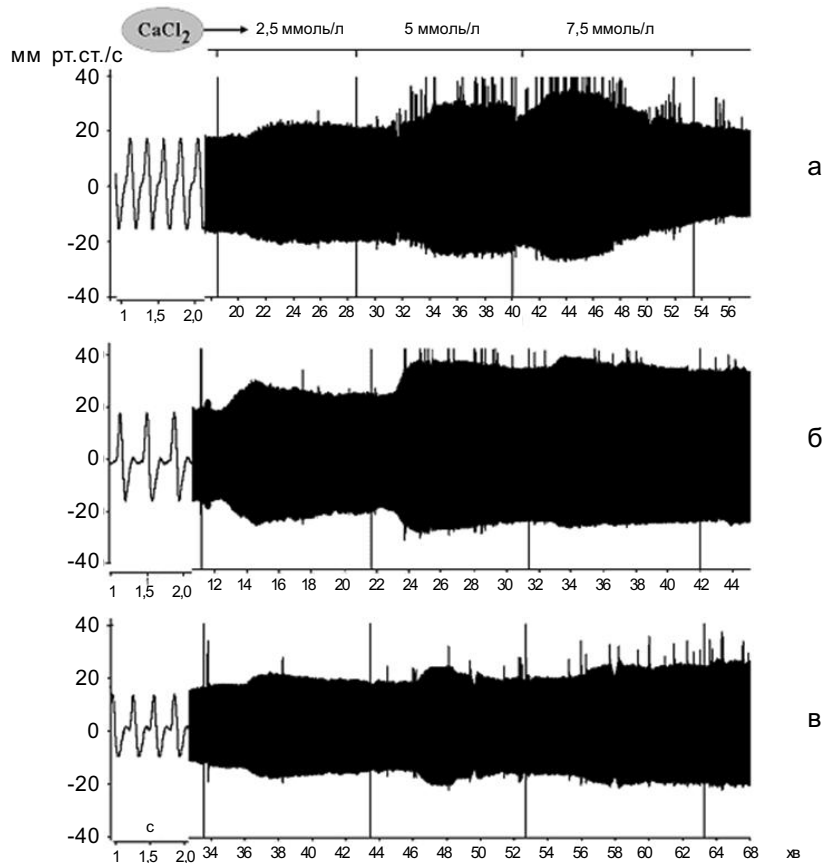


Рис. 3. Зміни скорочувальної активності міокарда при підвищенні концентрації іонів кальцію у перфузійному розчині у контрольних щурів (а), у щурів після курсу фізичного навантаження плаванням без (б) і після введення L-NAME (в)

контрольних тварин спостерігалася у відповідь на введення 7,5 ммоль/л CaCl_2 , а у тренуваних – на 10 ммоль/л CaCl_2 , що було підтвердженням наявності потужних функціональних резервів міокарда як наслідок його адаптації до фізичного навантаження. У контрольних тварин при 10 ммоль/л, а у тренуваних – тільки при 12,5 ммоль/л CaCl_2 у перфузійному розчині відмічали зниження приросту скоротливої реакції міокарда. Отримані результати позитивно корелювали з даними про вивільнення мітохондріального фактора. У контрольній серії він рееструвався при більш низьких концентраціях Ca^{2+} : 7,5–10 ммоль/л, в той час як у адаптованих до тренування тварин – при 12,5 ммоль/л, що було ознакою зменшення чутливості сердець тренуваних щурів до дії Ca^{2+} , а отже, і до утворення мітохондріальних пор. Таким чином, навантаження плаванням супроводжувалося збільшенням ефективності обміну кальцію між кардіоміоцитами та позаклітинним середовищем, а також зменшенням чутливості сердець до утворення мітохондріальних пор під дією Ca^{2+} .

Ми припустили, що механізм адаптації до фізичного навантаження здійснюється через активацію синтезу оксиду азоту. Як відомо, оксид азоту, що генерується при окисненні L-аргініну кальційзалежною конститутивною NO-синтазою (eNOS), відіграє одну з провідних ролей у регуляції функціональної активності міокарда завдяки своїм вазодилаторним ефектам [28]. Крім тонуусу судин [3, 16], NO здатний впливати на дихальну активність мітохондрій та чутливість мітохондріальних пор до відкриття [7, 9, 14, 32]. Виникає питання – чи превалюють будь-які ефекти NO при розвитку адаптаційних реакцій міокарда при тренуванні: його пригнічувальна дія на проникність мітохондріальних мембран або суто дилаторні впливи?

Нами встановлено, що блокада синтезу оксиду азоту за допомогою введення L-NAME практично скасовувала ефект адаптації до

фізичного тренування плаванням. Показники функціонального стану серця контрольних щурів і тренуваних щурів, яким вводили L-NAME, практично збігалися (див. таблицю). Це також стосувалось як реакції сердець на додавання CaCl_2 (рис. 4), форми кривої Франка-Старлінга (див. рис. 1), так і динаміки вивільнення мітохондріального фактора.

Таким чином, підвищення коронарного потоку і скорочувальної активності міокарда, збільшення функціональних резервів серця як наслідок адаптації до фізичних навантажень плаванням зумовлені дією оксиду азоту, оскільки блокада ферментів його синтезу нівелювала спостережувані нами адаптаційні можливості серця. Ці висновки підтверджуються даними біохімічних досліджень, які вказують на істотні зміни в системі синтезу NO як результату адаптації до регулярних фізичних навантажень плаванням [1]. Встановлено, що в мітохондріях, отриманих із сердець тренуваних щурів, спостерігалася стимуляція активності eNOS, iNOS і нітратредуктази, а вміст нітрат-аніона – маркера інтенсивності утворення і деградації пероксинітриду достовірно знижувався. Таким чином, формування адаптаційних можливостей міокарда при фізичному навантаженні зумовлено здатністю ендотелію коронарних судин і перикарда продукувати оксид азоту.

Механізми адаптації серця до фізичного навантаження досить широко досліджуються. Багато уваги приділяється вивченню ролі білків теплового шоку [20] і антиоксидантів [17]. Нині відомо, що фізичні тренування знижують генерацію вільних радикалів кисню мітохондріями [33], збільшують експресію ендогенних антиоксидантних ферментів та інших антиапоптогенних протеїнів [21], індукують ефект прекодиціювання у дорослих [39] і відновлюють його у старих тварин [8]. Показано підвищення при тренуванні експресії різних ізоферментів NOS [25, 35, 36]. При тривалих навантаженнях великої

інтенсивності зростає експресія iNOS [37], за помірних – cNOS [36]. Згідно з нашими результатами, адаптація до фізичного навантаження плавання супроводжувалася підвищенням мембранного потенціалу мітохондрій, що може свідчити про ефективність роботи дихального ланцюга і мінімізацію протонного витоку, а також зменшення чутливості сердець до утворення мітохондріальних пор під дією Ca^{2+} , оскільки у тренуваних щурів вивільнення мітохондріального фактора в коронарне русло реєструвалося при значно більших концентраціях іонів кальцію в перфузійному розчині, ніж у контрольних тварин. Останнє підтверджується даними, отриманими на суспензії мітохондрій серця щурів [6]. Тренування щурів протягом 10 тиж на тредмілі також призводило до збільшення на 45 % кількості Ca^{2+} , який необхідний для відкриття мітохондріальних пор [26]. Регулярні

фізичні тренування зменшували чутливість мітохондріальних пор до Ca^{2+} за наявності субстратів для комплексу II. У такому разі цілком логічно, що реперфузійні порушення функції серця також проявлялися меншою мірою [5, 19, 12, 24].

Кардіопротекторний механізм, що формується у клітині при адаптації до фізичного тренування, може бути зумовлений насамперед істотним зростанням коронарного потоку, про що свідчать результати наших і інших досліджень [38]. Вазодилаторний ефект багато в чому є результатом дії оксиду азоту, збільшення акумуляції якого при фізичному навантаженні є наслідком підвищення експресії й активності NOS [10, 23, 30]. Одночасно NO здатен виступати ефективним інгібітором мітохондріальних пор [7, 32], і ми продемонстрували посилення цих його властивостей при тренуванні. Ймовірно, всі клітинні механізми, що

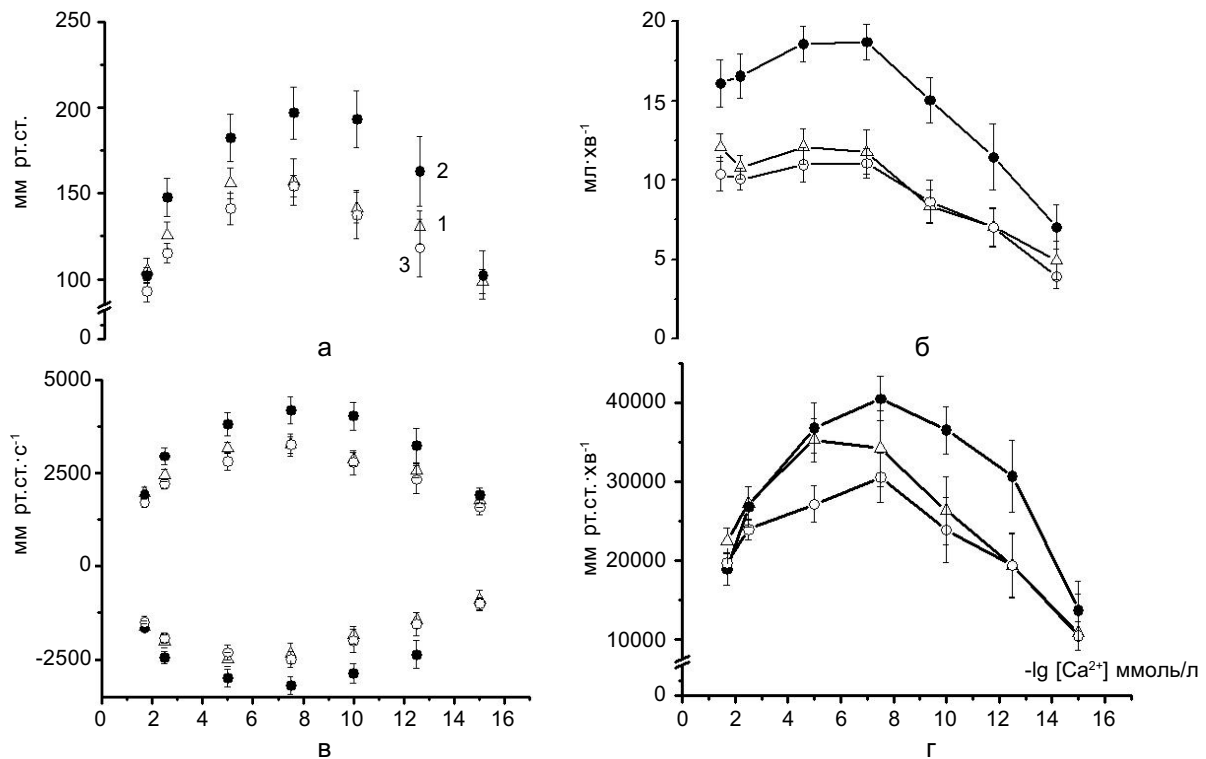


Рис. 4. Вплив блокади синтезу NO на зміни показників функціонального стану серця у відповідь на підвищення у перфузійному розчині концентрації Ca^{2+} у щурів без і після курсу фізичного навантаження плаванням: а – тиск, що розвивається у лівому шлуночку; б – коронарний потік; в – швидкість скорочення і розслаблення міокарда; г – інтенсивність скоротливої функції; 1 – контроль, 2 – треновані щури, 3 – треновані щури і введення L-NAME

спрямовані на блокаду утворення мітохондріальних пор і зниження проникності мітохондріальних мембран, будуть робити внесок у загальний захисний ефект, що спостерігається при адаптації серця до фізичного навантаження.

ВИСНОВКИ

1. Адаптація щурів до фізичного навантаження плаванням протягом 4 тиж супроводжувалася покращенням функціонального стану серця щурів, яке проявлялося у підвищенні скоротливої активності серця і коронарного потоку, збільшенні його функціональних резервів.

2. Навантаження щурів плаванням мало системний тренувальний ефект. Значення мембранного потенціалу у суспензії мітохондрій серця та печінки тренуваних тварин були вищими, ніж у контрольній серії.

3. Фізичне навантаження плаванням призводило до зменшення чутливості сердець щурів до утворення мітохондріальних пор під дією Ca^{2+} : вивільнення мітохондріального фактора у коронарний потік цих щурів спостерігали при дії більш високих концентрацій іонів кальцію.

4. Адаптаційні зміни функціонального стану серця, що формуються при фізичному тренуванні плаванням, були зумовлені впливом оксиду азоту, оскільки блокада ферментів його синтезу за допомогою L-NAME практично скасовувала спостережувані нами адаптаційні можливості серця.

Робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень.

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

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В РАЗВИТИИ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ МИОКАРДА ТРЕНИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ

У тренированных животных в значительных количествах синтезируется оксид азота. Он улучшает как процессы вазодилатации, так сократительную и насосную функцию сердца. Остается невыясненным его влияние на реакции

сердца в ответ на нагрузку объемом и кальцием, что наблюдается при длительных физических нагрузках. В экспериментах на изолированном по методу Лангендорфа сердце крыс улучшалось его функциональное состояние как следствие адаптации в течение 4-х недель к нагрузке плаванием, что проявлялось в увеличении сократительной активности миокарда на 20 % и коронарного потока (с $12,0 \pm 1,5$ до $16,0 \text{ мл/мин} \pm 0,8 \text{ мл/мин}$), уменьшении частоты сердечных сокращений, а также увеличении функциональных резервов сердца. При одинаковой степени растяжения левого желудочка сердца тренированных крыс развивали более мощную силу сокращения. Впервые установлено, что мембранный потенциал митохондрий сердца тренированных крыс был достоверно выше, чем у контрольных животных, что свидетельствует об увеличении сопряжения окислительного фосфорилирования. Курс тренировки плаванием предотвращал быстрый рост конечно-диастолического давления и появление аритмий при воспроизведении модели кальциевой перегрузки. У тренированных животных отмечали открытие митохондриальных пор при более высоких концентрациях кальция в перфузионном растворе. Показано, что адаптация к физической нагрузке и увеличение резервов сердца обусловлена влиянием оксида азота, блокада синтеза которого с помощью L-NAME (10^{-4} моль/л) отменяла указанные адаптационные изменения.

Ключевые слова: оксид азота, изолированное сердце, физическая тренировка плаванием, кривая Франка–Старлинга, кальциевая перегрузка.

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

NITRIC OXIDE AS THE MAIN MEDIATOR OF ADAPTATION TO PHYSICAL TRAINING

Intensive constitutive production of nitric oxide (NO) during physical training improves vasodilatation and heart function. However, it remains unclear how NO takes part in myocardial adaptation to workload, which is accompanied by an increased heart inflow and intracellular calcium content. Using isolated rat heart by Langendorf preparation, we studied myocardial response to gradually increased left ventricular volume (Frank-Starling law) and increasing concentration of Ca^{2+} in the perfusion solution (from 1.7mM to 12,5 mM) in trained and untrained rats. It was shown that 4 weeks swimming course improved heart function: heart rate was decreased; contractile activity (dP/dt max) and coronary flow were increased by 20% and 33%, respectively. Equal volume stretching of balloon in left ventricle provoked greater contraction in trained comparing to untrained hearts, demonstrating extended functional reserves after swimming course. Mitochondrial membrane potential was significantly increased in hearts of trained rats. Furthermore, training prevented fast increase of the end diastolic pressure during calcium upload. Mitochondrial factor release due to opening of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in trained hearts was detected at higher

concentrations of calcium that reveals extended calcium capacity of mitochondria and lesser sensitivity of MPTP to its inducer – calcium. Blockade of NO synthesis with L-NAME application of (10^{-4} M for 15 min) abolished reaction of trained heart during Frank-Starling and calcium upload. Thus, heart adaptation to physical training and extension of functional reserves in heart are provided by endogenous NO production. Key words: nitric oxide, Frank-Starling low, physical training, calcium upload, mitochondrial permeability transition, membrane potential.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Базілюк О.В., Коцюруба А.В., Степаненко Л.Г., Таланов С.О., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф. Вікові особливості змін системи оксиду азоту в судинах і плазмі за умов адаптації до фізичних навантажень // *Фізіол. журн.* – 2010. – **56**. – №1. – С. 3–12.
2. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия // *Биохимия.* – 1985. – **50**, №8. – С. 1350–1361.
3. Сагач В.Ф., Ткаченко М.Н., Дмитриева А.В. О роли эндотелия в реакции реактивной гиперемии коронарных сосудов // *Докл. АН СССР.* – 1989. – **307**, № 3. – С. 765–767.
4. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // *Фізіол. жнр.* – 2003. – **49**, №4. – С. 6–12.
5. Таланов С.А., Бурый В.А., Сагач В.Ф. Влияние адаптации к дозированым физическим нагрузкам на функцию миокарда крыс // *Нейрофизиология.* – 2009. – **41**, №1. – С. 41–47.
6. Чорна С.В., Таланов С.А., Струтинська Н.А., Вавилова Г.Л., Коцюруба А.В., Гайдай М.І., Сагач В.Ф. Вплив тривалих фізичних навантажень на зміни функції серця шурів при ішемії–реперфузії, чутливість кальцій індукованої мітохондріальної пори та експресію роз'єднувального білка 3 // *Фізіол. журн.* – 2010. – **56**, №1. – С.13–21.
7. Шиманская Т.В., Добровольский Ф.В., Вавилова Г.Л., Струтинская, Е.В. Рудык, Сагач В.Ф. NO-зависимая модуляция чувствительности открытия митохондриальной поры при ишемии–реперфузии изолированного сердца // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* – 2009. – **95**, №1. – С.28–37.
8. Abete P., Calabrese C., Ferrara N., Cioppa A., Pisanelli P., Cacciatore F., Longobardi G., Napoli C., Rengo F. Exercise training restores ischemic preconditioning in the aging heart // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2000. – **36**. – P.643–650.
9. Balakirev M., Khramtsov V., Zimmer G. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – **246**. – P. 710–718.
10. Bernstein R.D., Ochoa F.Y., Xu X.B., Forfia P., Shen W., Thompson C.I., Hintze T.H. Function and production of nitric oxide in the coronary circulation of the conscious dog during exercise. – *Circulat. Res.* – 1996. – **79**. – P. 840–848.
11. Borutaite V., Mildaziene V., Brown G.C., Brand M.D. Control and kinetic analysis of ischemia-damaged heart mitochondria: which parts of the oxidative phosphorylation system are affected by ischemia? // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – **1272**. – P. 154–158.
12. Bowles D.K., Starnes J.W. Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart // *J. Appl. Physiol.* – 1994. – **76**, issue 4. – P.1608–1614.
13. Brand M.D. in Brown G.C., Cooper C.E. Editors, *Bioenergetics: a practical approach.* – Oxford.: IRL Press. – 1995. – P. 39–62.
14. Brookes P., Salinas E., Darley-Usmar K., Eiserich J.P., Freeman B.A., Darley-Usmar V.M., Anderson P.G. Concentration-dependent effect of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P.20474–20479.
15. Dedkova E.N., Blatter L.A. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase // *J. Physiol.* – 2009. – **587**, №4. – P.851–872.
16. Endo T., Imaizumi T., Tagawa T., Shiramoto M., Ando S., Takeshita A. Role of nitric oxide in exercise-induced vasodilation of the forearm // *Circulat.* – 1994. – **90**. – P. 2886–2890.
17. French J.P., Hamilton K.L., Quindry J.C., Lee Y., Upchurch P.A., Powers S.K. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain // *FASEB J.* – 2008. – **22**, №8. – P. 2862–2871.
18. Hoydal M.A., Wisloff U., Kemi O.J., Britton S.L., Koch L.G., Smith G.L., Ellingsen O. Nitric oxide synthase type-1 modulates cardiomyocyte contractility and calcium handling: association with low intrinsic aerobic capacity // *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* – 2007. – **14**. – P.319–325.
19. Hwang H., Reiser P.J., Billman G.E. Effects of exercise training on contractile function in myocardial trabeculae after ischemia-reperfusion // *J. Appl. Physiol.* – 2005. – **99**, №1. – P.230–236.
20. Quindry J.C., Hamilton K.L., French J.P., Lee Y., Murlasits Z., Tumer N., Powers S.K. Exercise-induced HSP-72 elevation and cardioprotection against infarct and apoptosis // *J. Appl. Physiol.* – 2007. – **103**. – P. 1056–1062.
21. Kavazis A.N., McClung J.M., Hood D.A., Powers S.K. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli // *Amer. J. Physiol.* – 2008. – **294**. – P. H928–H935.
22. Kemi O.J., Ellingsen O., Smith G.L., Wisloff U. Exercise-induced changes in calcium handling in left ven-

- tricular cardiomyocytes // *Front Biosci.* – 2008. – **13**. – P.356–368.
23. Kingwell B.A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease // *FASEB J.* – 2000. – **14**. – P.1685–1696.
24. Le Page C., Noirez P., Counrty J., Riou B., Swyngedauw B., Besse S. Exercise training improves functional post-ischemic recovery in senescent heart // *Exp. Geront.* – 2009. – **44**. – P.177–182.
25. Maiorana A., O'Driscoll, Tayler R., Green D. Exercise and the nitric oxide vasodilator system // *Sports Med.* – 2003. – **33**, № 7. – P.1013–1035.
26. Marcil M., Bourduas K., Ascah A., Burelle Y. Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca^{2+} -induced permeability transition pore opening in heart mitochondria // *Amer. J. Physiol.* – 2006. – **290**. – P. H1549–H1557.
27. Nadtochiy S.M., Tompkins A., Brookes P.S. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and precondition: implications for pathology and cardioprotection // *Biochem. J.* – 2006. – **395**. – P. 611–618.
28. Prendergast B.D., Sagach V.F., Shah A.M. Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart // *Circulation.* – 1997. – **96**, №4. – P.1320–1329.
29. Rimbaud S., Garnier A., Ventura-Clapier R. Mitochondrial biogenesis in cardiac pathology // *Pharmacol. Res.* – 2009. – **61**. – P.131–138.
30. Roberts C.K., Barnard R.J., Jasman A., Balon T.W. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **277**. – P. E390–E394.
31. Sagach V.F., Kindyalyuk A.M., Kovalenko T.N. Functional hyperemia of skeletal muscle: role of endothelium // *J.Cardial. Pharmacol.* – 1992. – **20**, suppl. 12. – P.S170–S175.
32. Shimanskaya T.V Goshovska Y., Sagach V. The role of mitochondrial permeability transition pore in modulation of oxygen cost of myocardial work by endogenous NO. – In: *Advances in Biomedical Research.* – Cambridge. – 2010. – P.313–317.
33. Starnes J.W., Barnes B.D., Olsen M.E. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca^{2+} -induced dysfunction // *J. Appl. Physiol.* – 2007. – **102**. – P. 1793–1798.
34. Stolen T.O., Hoydal M.A., Kemi O.J., Catalucci D., Ceci M., Aasum E., Larsen T., Rolim N., Condorelli G., Smith G.L., Wisluff U. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca^{2+} control, and SR Ca^{2+} release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy // *Circulat. Res.* – 2009. – **105**. – P.527–536.
35. Strensberg A. Keller C., Hillig T., Frosig C., Wojtaszewski J.F., Pedersen B.K., Pilegaard H., Sander M. Nitric oxide production is a proximal signaling event controlling exercise-induced mRNA expression in skeletal muscle // *FASEB J.* – 2007. – **21**, №11. – P.2683–2694.
36. Sun M., Zhang M., Gu J., Qian F.L., Gu J.Z., Chen H. Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilatation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase // *Hypertens Res.* – 2008. – **31**, №5. – P. 805–816.
37. Tatchum-Talom R., Schulz R., McNeill J.R., Khadour F.H. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in skeletal muscle by swim training // *Amer. J. Physiol.* – 2000. – **279**, №4. – P.H1757–H1766.
38. Taylor R.P., Ciccolo J.T., Starnes J.W. Effect of exercise training on the ability of the rat heart to tolerate hydrogen peroxide // *Cardiovasc. Res.* – 2003. – **58**, №3. – P.575–581.
39. Yamashita N., Hoshida S., Otsu K., Asahi M., Kuzuya T., Hori M. Exercise provides biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation // *J. Exp. Med.* – 1999. – **189**. – P. 1699–1706.