

# Вплив кальцієвого навантаження на утворення мітохондріальних пор *in situ* і експресію генів мітохондріальних роз'єднувальних білків у серці тренуваних щурів

Ю.В. Гошовська, Н.А. Струтинська, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: goshovska@biph.kiev.ua

*На моделі ізольованого за Лангендорфом серця вивчали вплив кальцієвого навантаження (від 1,7 до 15 ммоль/л у перфузаті) на скоротливу активність, вивільнення мітохондріального фактора (як маркера утворення мітохондріальних пор транзитornoї провідності, МПТП) і експресію генів роз'єднувальних білків UCP2/3 у нетренованих і тренуваних плаванням щурів. Виявили, що у разі покращення функції ізольованого серця тренуваних протягом 4 тиж щурів збільшувалась експресія UCP3, але не UCP2. Поступове збільшення вмісту кальцію у перфузаті супроводжувалося природою скоротливої функції, більш вираженим у тренуваних щурів. Однак 10 ммоль/л і більш високі концентрації кальцію призводили до аритмії та різкого зниження скоротливості ізольованого серця, що більше проявлялось у нетренованих щурів. Фізичні навантаження запобігали кальційіндукованому вивільненню мітохондріального фактора, здійснюючи стабілізуючий вплив на мембрани мітохондрій, який нівелювався блокатором синтезу оксиду азоту (L-NAME). Виявили кальційчутливий характер експресії генів UCP: збільшення мРНК UCP3 при 5 ммоль/л кальцію і різке зниження експресії UCP2/3 при 12,5 ммоль/л його як у тренуваних, так і нетренованих тварин, що дає змогу стверджувати про їх участь у регуляції кальцієвого гомеостазу. Наші результати вказують, що модель кальцієвого навантаження ізольованого серця може слугувати тестом для титрування МПТП *in situ*, а активація UCP при тренуваннях відіграє захисну роль при збільшенні вмісту позаклітинного кальцію разом з оксидом азоту, інгібуючи утворення МПТП.*

*Ключові слова: серце; оксид азоту; кальцієве навантаження; мітохондріальні роз'єднувальні білки; мітохондріальна поря; тренування; плавання.*

## ВСТУП

Іони кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ) опосередковують низку фізіологічних процесів серед яких скорочення м'язів, вивільнення нейротрансмітерів, ендцитоз тощо. Потраплення  $\text{Ca}^{2+}$  в середину кардіоміоцита ініціює його скорочення (систола), а виведення цього катіона з цитоплазми у внутрішньоклітинні депо і в міжклітинний простір супроводжується розслабленням (діастолюю). При цьому концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі зменшується приблизно на порядок, а при новому акті скорочення – на порядок збільшується. Такі різкі перепади можливі завдяки достатньому вмісту АТФ,

що продукується мітохондріями для забезпечення роботи  $\text{Ca}^{2+}$ -помп саркоплазматичного ретикулула. Важлива роль мітохондрій у регуляції кальцієвого гомеостазу зумовлюється наявністю селективних кальцієвих каналів у мітохондріальних мембранах і здатністю мітохондрій накопичувати цей катіон (кальцієва ємність мітохондрій). Через зовнішню мембрану мітохондрій  $\text{Ca}^{2+}$  рухається через потенціалзалежний аніонний канал, а через внутрішню – рутенійчутливим кальцієвим уніпортером (mitochondrial calcium uniporter, MCU). Електрохімічний градієнт, що підтримує мембранний потенціал мітохондрій

© Ю.В. Гошовська, Н.А. Струтинська, В.Ф. Сагач

( $\Delta\psi_m$ ) на рівні 180 мВ, є рушійною силою для поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  уніпортером. З матриксу мітохондрій  $\text{Ca}^{2+}$  виводиться за допомогою активного транспорту переважно через  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник [1]. Спряжене зі збільшенням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі поглинання цих іонів мітохондріями може стимулювати дихання та синтез АТФ, однак за дуже високих концентрацій імовірно є відкривання мітохондріальних пор транзиторної провідності (mitochondrial permeability transition pore, МПТП) і ініціація апоптозу [2, 3]. Відомо, що пригнічення утворення МПТП при реперфузії за допомогою фармакологічних агентів (циклоспорин А, коензим Q, ендотеліальний-моноцит активуючий протеїн) має кардіопротекторний ефект [4–6], забезпечує швидке відновлення АТФ-залежних процесів, в тому числі відкачування  $\text{Ca}^{2+}$  з цитоплазми кардіоміоцитів. Таким чином, регуляція транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в кардіоміоцитах є важливою з точки зору підтримки спряження процесів скорочення–розслаблення міокарда і виживання клітин у несприятливих умовах.

Помірні фізичні тренування є чудовим засобом для попередження розвитку патологій серцево-судинної системи. Серед механізмів, що активуються тренуваннями, можна виділити збільшення ефективності викачування  $\text{Ca}^{2+}$  із саркоплазми в ретикулум та в позаклітинне середовище  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінником, а також збільшення спряження роботи дихального ланцюга і синтезу АТФ. Однак найважливішим ефектом тренувань, з нашої точки зору, є збільшення кальцієвої ємності мітохондрій і порогової концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , що викликає утворення МПТП. Встановлено, що набухання мітохондрій серця тренуваних тварин за дії тієї ж самої концентрації кальцію було значно меншим, ніж у нетренованих [7]. Оскільки утворення МПТП *in vitro* (в суспензії мітохондрій) ініціюється великими дозами кальцію, вважається, що її відкривання є подією, характерною для патологічного процесу. Роль МПТП за нормальних умов, в тому числі і в розвитку адаптації до фізичних

навантажень, залишається маловивченою [8]. Тестом на оцінку утворення МПТП *in situ* (в моделі ізольованого серця) можуть виступати спеткрофотометричні дослідження мітохондріального фактора в елюатах. Наявність великої кількості продуктів розпаду аденозних нуклеотидів, які за нормальних умов не виявляються у відтоці, буде характеризуватися збільшенням оптичного поглинання цих розчинів в ультрафіолетовій ділянці спектра і вказуватиме на збільшення проникності мітохондріальних мембран внаслідок утворення МПТП [9, 10]. Дозоване збільшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у перфузійному розчині дасть змогу з'ясувати, коли саме утворюються МПТП, і як це співвідноситься із скоротливою функцією міокарда.

Мітохондріальні роз'єднувальні білки (UCP) є одним із визнаних регуляторів  $\Delta\psi_m$  і відіграють кардіопротекторну роль, захищаючи від окисного стресу [11, 12], що може також мати важливе значення у формуванні адаптаційних змін міокарда до фізичних навантажень. Раніше висувалося припущення, що саме UCP є білками, що не просто регулюють обмін кальцію, а і є складовими субодіницями кальцієвого уніпортера [13]. Було показано, що надекспресія UCP2 та UCP3 збільшує здатність мітохондрій поглинати  $\text{Ca}^{2+}$ , в той час як трансфекція клітин HeLa інтерферуючими РНК значно знижує цю здатність. Водночас відомо, що кальцієвий уніпортер активується безпосередньо поліненасиченими жирними кислотами [14], як і UCP. Було визначено домен, який відповідає за кальцієву провідність – місце найбільшої гомології UCP2 та UCP3 – друга трансмембранна петля. Експерименти з надекспресією мутантних у цій ділянці білків у культурі ендотеліальних клітин показали, що характерного збільшення кальцієвої провідності мембран не відбувається. Це вказує на участь UCP2 та UCP3 в поглинанні  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями у відповідь на підвищення його концентрації в цитозолі. Зважаючи на те, що МПТП і UCP можуть бути учасниками кальцієвого

гомеостазу, дослідження цих двох механізмів у відповіді міокарда на збільшення концентрації кальцію при фізичних тренуваннях становить значний науковий інтерес.

Метою нашої роботи було дослідити вивільнення мітохондріального фактора і експресію генів *UCP* у відповідь на дозоване збільшення концентрації кальцію у перфузійному розчині на моделі ізольованого серця.

## МЕТОДИКА

Експерименти виконували на дорослих самцях шурів лінії Вістар віком 5-6 міс, масою 300–330 г. Тварин було розділено на три групи: контрольну і дві дослідні, по 8 тварин у кожній. Досліди проводили відповідно до Директиви 2010/63/EU Європейського парламенту про захист тварин, що використовуються для наукових цілей (22.09.2010), Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (редакція від 13.02.20). Щури дослідної групи тренувалися плаванням у резервуарі з водою при 30°C протягом 4 тиж, 5 днів на тиждень, починаючи з 2-х хвилин у перший день, збільшуючи час на 4 хв. Тварин брали в експеримент на наступний день після останнього сеансу плавання. Після декапітації і розтину грудної клітки серця вилучали і швидко поміщали в охолоджений розчин Кребса–Хензеліята. Серце за аорту підвішували до канюлі і здійснювали ретроградну перфузію коронарних судин за умов постійного тиску (80 мм рт. ст.) при 37°C розчином Кребса–Хензеліята (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> – 1,7. Перфузійний розчин аерували карбогеном (95% O<sub>2</sub> і 5% CO<sub>2</sub>). Скоротливу активність ізольованого серця реєстрували за допомогою латексного балончика, введеного в порожнину лівого шлуночка, з'єднаного з тензодатчиком 746 (Мінгограф-82, «Eleva», Швеція) та програмного забезпеченням Global Lab. Вивчали тиск у лівому шлуночку, його першу похідну і коронарний потік. Після

стабілізації роботи серця проводили кальцієве навантаження, поступово збільшуючи концентрацію кальцію в перфузійному розчині до 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 ммоль/л. Перфузія кожною з концентрацій становила 15 хв. Синтез NO блокували за допомогою L-NAME (N (G)-нітро-L-аргінін метилестергідрохлорид, «Sigma», США) у концентрації 10<sup>-4</sup> моль/л, яким здійснювали перфузію серця протягом 15 хв до початку кальцієвого навантаження.

Проби відтікаючого від серця розчину об'ємом 2-3 мл відбирали в кінці перфузії. Вимірювали оптичну щільність в ультрафіолетовій ділянці спектра ( $\lambda = 230\text{--}260$  нм). Результати зображали у вигляді графіків залежності екстинції від довжини хвилі. Мітохондріальний фактор як маркер відкривання МПТП розраховували як різницю між максимальним значенням екстинції (при 245–250 нм) та мінімальним (при 230–235 нм) у кожному експерименті.

Для дослідження експресії генів *UCP* здійснювали забір верхівки серця і виділяли тотальну РНК за допомогою реагента TRIZOL («Sigma», США). Зворотну транскрипцію або синтез комплементарної до РНК молекули ДНК проводили за допомогою набору RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва) і 300–600 нг тотальної РНК, випадковий гексамерний праймер. Отриману одноланцюгову ДНК використовували для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для ампліфікації фрагментів генів *UCP2* та *UCP3*, а також фрагмент гена  $\beta$ -актину як внутрішнього контролю. Послідовність нуклеотидів у праймерах була такою: прямий – 5'-TCATCAAAGATACTCTCCTGAAAGC-3', зворотний – 5'-TGACGGTGGTGCAGAAGC-3' для гена *UCP2* [15]; прямий – 5'-GTGACCTATGACATCATCAAGGA-3', зворотний – 5'-GCTCCAAAGGCAGAGACAAAG-3' для гена *UCP3* [15, 16]; прямий 5'-CCTCTGACCCTAAGGCCAA-3', зворотний 5'-AGCCTGGATGGCTACGTACA-3' для гена  $\beta$ -актину [16].

Суміш для ампліфікації містила 5 мкл 5-кратного буфера для полімеразної ланцюгової реакції, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 30 пмоль/л кожного з праймерів («Metabion», Німеччина), 0,5 ОД Таq-полімерази («Амплиценс», Росія) і ДНК-матрицю, отриману в результаті зворотної транскрипції. Об'єм проби доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmp System 2700» («Applied Biosystems», США). Ампліфікація фрагментів вказаних генів складалася з 32 циклів, кожен з яких включав: денатурацію – 94°C (50 с), гібридизацію праймерів – 58°C (1 хв) і елонгацію – 72°C (1 хв). Ампліфіковані фрагменти розділяли за допомогою електрофорезу у 1,5%-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію. Оцінювали яскравість ампліфікатів за допомогою транслюмінатора і програмного забезпечення

ViTan («Биоком», Росія). Розраховували відношення інтенсивності свічення ампліфікатів UCP до  $\beta$ -актину.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням дисперсійного аналізу (ANOVA) з поправкою Тукі, вірогідними вважали зміни при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Збільшення вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  в перфузійному розчині супроводжувалось інотропною стимуляцією ізольованого серця. Максимальний тиск у лівому шлуночку у всіх трьох групах був зафіксований за концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  7,5 ммоль/л, однак приріст цього показника у тренованих тварин був значно більший і становив в середньому 94,6 мм рт. ст. щодо 52,0 мм рт. ст. у нетренованих (таблиця). Максимальна швидкість скорочення і розслаблення міокарда також були найвищими за концентрації 7,5

**Вплив вмісту іонів кальцію в розчині Кребса–Хензеляйта на показники кардіодинаміки ізольованого серця щурів ( $M \pm m$ ,  $n = 8$ )**

Показник	Схема досліджу	Концентрація [ $\text{Ca}^{2+}$ ], ммоль/л						
		1,7	2,5	5	7,5	10	12,5	15
Тиск у лівому шлуночку, мм рт.ст.	Контроль	104,7±7,2	125,5±8,0	155,7±8,7	156,7±13,6	141,5±8,9	130,2±9,8	98,5±7,1
	Тренування	102,2±4,3	147,8±11,0	182,2±13,9	196,8±15,2	193,1±16,4	162,7±20,2	102,3±14,2
	Тренування і L-NAME	92,8±6,3	115,2±5,8	141,0±9,2	154,2±6,2	137,6±14,0	118,2±16,8	83,2±9,4
Швидкість скорочення міокарда, мм рт.ст.·с <sup>-1</sup>	Контроль	1956±162	2436±168	3171±161	3251±300	2864±175	2557±191	1765±193
	Тренування	1912±83	2946±230	3803±314	4181±362	4024±375	3233±465	1905±203
	Тренування і L-NAME	1720±138	2207±123	2815±231	3253±222	2782±324	2324±374	1575±198
Швидкість розслаблення міокарда, мм рт.ст.·с <sup>-1</sup>	Контроль	1613±157	2010±170	2502±185	2342±273	1843±239	1449±216	901±265
	Тренування	1652±110	2454±163	2997±234	3193±243	2875±259	2367±377	1014±141
	Тренування і L-NAME	1498±152	1933±137	2311±210	2497±220	1993±307	1555±318	1012±183
Коронарний потік, мл·хв <sup>-1</sup>	Контроль	12,05±0,8	10,8±0,7	12,1±1,12	11,75±1,4	8,35±1,0	7,02±1,2	4,9±1,2
	Тренування	16,0±1,5	16,5±1,3	18,5±1,1	18,6±1,1	15,0±1,4	11,4±2,0	7,0±1,3
	Тренування і L-NAME	10,36±1,0	10,0±0,7	10,9±1,1	11,0±0,9	8,6±1,37	7,0±1,18	3,9±0,8

ммоль/л, і їх прирости становили 2269 і 1541 мм рт. ст.  $\cdot$  с $^{-1}$  відповідно у тренуваних тварин, що вдвічі більше, ніж у нетренуваних (1295 і 749 мм рт. ст.  $\cdot$  с $^{-1}$ ). Ці результати свідчать про збільшення ефективності роботи серця після курсу плавання, їх покращену здатність відповідати посиленням скоротливості на дію кальцієвих навантажень. Перфузія тренуваних сердець сполукою L-NAME запобігала двократному збільшенню приросту тиску у лівому шлуночку, який становив всього 61,4 мм рт. ст., а також максимальної швидкості скорочення і розслаблення міокарда (1533 і 999 мм рт. ст. відповідно), що доводить важливу роль NO у формуванні адаптації до фізичних навантажень не лише у вигляді покращення скоротливості, але і здатності утилізувати великі концентрації кальцію, які можуть збільшуватися за різних фізіологічних і патологічних умов.

Важливим показником покращення роботи серця за дії фізичних навантажень є збільшення коронарного потоку, який у тренуваних тварин був на 32% більшим, ніж у нетренуваних (див. таблицю). Блокатор NO знижував коронарний потік тренуваних тварин на 35%. Крім того, у відповідь на кальцієве навантаження до 7,5 ммоль/л він збільшувався на 16% у групі тренуваних тварин, і лише на 6% за попередньої дії блокатора NO. Таким чином, наші результати

вказують на значну роль NO в адаптації до фізичних тренувань і формування здатності кардіоміоцитів утилізувати великі концентрації кальцію.

Після максимальної інотропної реакції за дії 7,5 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у всіх трьох групах спостерігався спад скоротливої функції ізольованого серця у разі дії наступного збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , при чому блокатор NO прискорював зменшення усіх досліджуваних показників у тренуваних тварин. При 15 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  спостерігалися значні порушення скоротливої активності у вигляді екстрасистолії та епізоди фібриляції.

Спектрофотометричне дослідження показало, що оптична щільність елюатів сердець тренуваних тварин, зібраних при 2,5 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , відрізнялася найменшою кількістю загального вмісту метаболітів (рис. 1, а). Це може свідчити про більшу ефективність перебігу метаболічних процесів у міокарді тренуваних тварин як результат адаптації до фізичних навантажень. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  5 і 7,5 ммоль/л не викликало суттєвих змін оптичної щільності серцевих елюатів, що узгоджується з показниками кардіодинаміки, і підтверджує здатність сердець усіх трьох груп тією чи іншою мірою утилізувати  $\text{Ca}^{2+}$  за таких умов. Подальше зростання оптичної щільності елюатів відбувалося поступово

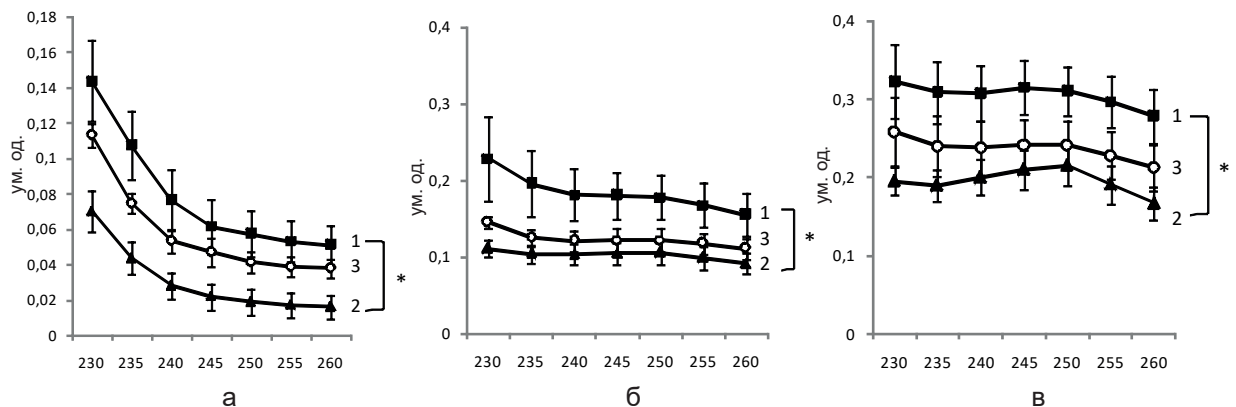


Рис. 1. Зміни оптичної щільності розчинів, що відтікають від ізольованого серця при 2,5 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  (а), 12,5 ммоль/л (б), 15 ммоль/л (в). 1 – контроль, 2 – тренування, 3 – тренування і L-NAME. \*P < 0,05



відповідно до збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в перфузаті. Найбільша екстинція спостерігалась у розчинів, зібраних при 15 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  (див. рис. 1, б, в). Мітохондріальний фактор становив у контрольних щурів  $0,035 \pm 0,007$  ум. од., у тренуваних –  $0,027 \pm 0,008$  ум. од., у тренуваних за дії L-NAME –  $0,016 \pm 0,007$  ум. од. ( $P > 0,05$ ). Незважаючи на нижчий фактор у групі з попередньою блокадою NO, оптична щільність елюатів цієї групи займала проміжне місце між тренуваними і не тренуваними тваринами як при 2,5, так і при 12,5 і 15 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  (див. рис. 1). Варто відмітити, що отримані значення мітохондріального фактора були значно меншими (приблизно в 4–6 разів), ніж при ішемії-реперфузії ізольованого серця щурів такого самого віку [6] і навряд чи свідчать про відкриття великої кількості МПТП. Однак треба враховувати постійне вимивання метаболітів із коронарного русла перфузійним розчином, тоді як при моделюванні ішемії метаболіти накопичуються протягом певного часу. Наші результати вказують на те, що збільшення продукції NO при тренуваннях є важливим тригером розвитку тренуваності і механізмом збільшення резервів міокарда, одним з яких є здатність забезпечувати ефективний менеджмент кальцієвих транзєнтів, імовірно, внаслідок збільшення кальцієвої ємності саркоплазматичного ретикулула і/чи мітохондрій.

Ми виявили, що в серці нетренованих щурів після введення 5 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  підвищувалося співвідношення мРНК UCP3/актин до  $170 \pm 4,2\%$  ( $P < 0,01$  щодо контролю; рис. 2). Однак при 12,5 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у перфузаті це співвідношення знижувалося і становило  $122,1 \pm 7,3\%$  ( $P < 0,01$  щодо навантаження 5 ммоль/л). Такі коливання експресії за досить короткий час вказують на те, що активація UCP3 може бути одним із механізмів швидкого реагування на збільшення концентрації кальцію в міокарді, а його експресія – регулюватися за принципом зворотного зв'язку.

Тренування плаванням підвищувало ек-

спресію гена UCP3 у серці: співвідношення мРНК UCP3/актин становило  $124,1 \pm 2,7\%$  ( $P < 0,01$ ; рис. 3). При цьому експресія UCP2 залишалася незмінною. Кальцієві навантаження до 12,5 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у перфузаті призводили до достовірного зниження експресії як UCP2, так і UCP3 порівняно з групою тренуваних тварин. Таким чином, ми виявили зниження експресії генів UCP у разі дії великих концентрацій кальцію у серці як тренуваних, так і нетренованих тварин.

Дослідження мітохондріальних механізмів відповіді серця на підвищення концентрації позаклітинного кальцію є важливою задачею, бо неконтрольоване збільшення концентрації кальцію і перевантаження кардіоміоцитів призводить до утворенням МПТП, виходом цитохрому C з мітохондрій і ініціацією апоптозу. Разом з тим роль МПТП за нормальних умов і при фізичних навантаженнях залишається не з'ясованою. Раніше нами було показано, що серця тренуваних тварин є більш стійкими до дії ішемії-реперфузії, а мітохондрії серця і відповідно МПТП – менш чутливі до впливу кальцію [7]. При цьому збільшувалась активність конститутивної NO-синтази. Наразі ми показали, що проведення кальцієвого навантаження може використовуватися як тест на відкриття МПТП *in situ*, а NO, який продукується при

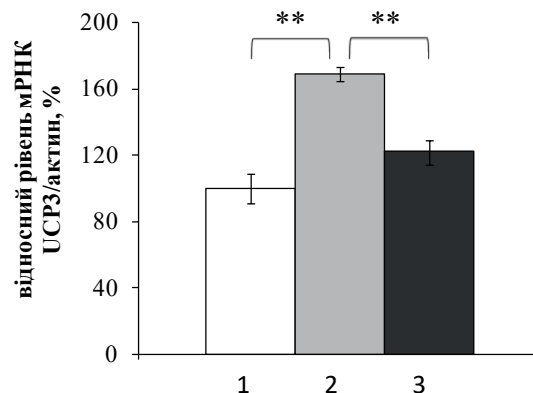


Рис. 2. Експресія гена мітохондріального роз'єднувального білка 3 (UCP3) у серці нетренованих щурів в контролі (1, n = 5), за дії 5 (2, n = 6) і 12,5 (3, n = 6) ммоль/л кальцію в перфузійному розчині. \*\* $P < 0,01$

фізичних тренуваннях є важливим інгібітором утворення МПТП і може бути одним із механізмів збільшення кальцієвої ємності мітохондрій кардіоміоцитів при адаптації до фізичних навантажень і/або регулятором кальцієвих транз'єнтів.

Відомо, що фізичні навантаження плавання чи тренування на тредмілі збільшують вміст мРНК UCP3 у скелетних м'язах щурів [17–19]. Це можна пояснити активацією ліполізу, внаслідок чого в крові збільшується концентрація вільних жирних кислот, які через рецептор, що активується проліфератором пероксидом (PPAR), стимулюють експресію UCP у м'язах. Цікавий аспект однієї з праць [19] полягає у надзвичайно швидкій активації експресії мРНК UCP3, збільшення якої в скелетних м'язах в 2,5–3 рази автори спостерігали вже через 30 хв одноразових тренувань або гіпоксії. Однак експресія мРНК UCP2 та UCP3 у скелетних м'язах і серці щурів може знижуватися практично вдвічі внаслідок дуже тривалих фізичних навантажень (8-тижнева програма тренувань на тредмілі) [20]. У наших досліджах експресія UCP2 залишалася незмінною, але спостерігали збільшення експресії UCP3, що збігається з даними літератури. З одного боку, це може вказувати на

помірність обраної програми тренувань для тварин, з іншого – на дещо відмінні функції для обох UCP, які у серці можуть відповідати на різні стимули. Крім того, збільшення їх експресії в скелетних м'язах і серці при фізичних навантаженнях супроводжується помірним зменшенням  $\Delta\psi_m$ , продукції АФК і збільшенням ефективності окисного фосфорилування [17, 21]. Ми вважаємо, що зниження продукції АФК UCP-залежним чином може здійснювати антиоксидантний ефект і робити внесок у зниження чутливості МПТП до дії  $Ca^{2+}$ .

Наші результати вказують на те, що UCP беруть участь у відповіді на зміну концентрації  $Ca^{2+}$  і, ймовірно, задіяні у регуляції кальцієвого гомеостазу. Невеликі дози  $Ca^{2+}$  (5 ммоль/л), при яких реєстрували зростання скоротливої активності міокарда, стимулювали експресію UCP3 у інтактних тварин. При підвищенні концентрації кальцію в перфузаті до 12,5 ммоль/л, коли пригнічується роботи серця, експресія UCP3 зменшується, оскільки виникають умови для утворення МПТП, порушення роботи мітохондрій і відповідно зниження  $\Delta\psi_m$ . Схожу картину змін експресії генів UCP2/3 спостерігали в серцях тренуваних щурів, де при високих дозах  $Ca^{2+}$  їх експресія також достовірно знижувалась. Ймовірно це є одним із механізмів зменшення кальцієвої ємності, оскільки було показано значне зниження поглинання  $Ca^{2+}$  мітохондріями при використанні інтерферуючих РНК до UCP2 і UCP3 [13], що ще раз підтверджує участь UCP у регуляції кальцієвого гомеостазу. Однак наразі важко сказати, за допомогою якою механізму це відбувається. Можна припустити, що кальційтранспортна функція UCP не пов'язана з протон-провідною їх активністю, оскільки чим більший  $\Delta\psi_m$  – тим більше повинне бути поглинання кальцію мітохондріями, а зниження  $\Delta\psi_m$  внаслідок роботи UCP має знижувати це поглинання. Незважаючи на те, що поглинання великої кількості кальцію може прискорювати роботу дихального ланцюга і збільшувати продукцію

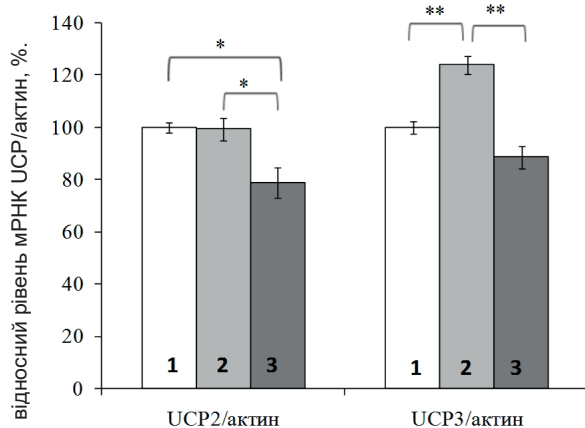


Рис. 3. Експресія генів роз'єднувальних білків (UCP2 та UCP3) у серці контрольних (1, n = 6), тренуваних тварин (2, n = 8) і тренуваних тварин за дії 12,5 ммоль/л  $Ca^{2+}$  (3, n = 5). \*P < 0,05, \*\*P < 0,01

АФК, самі іони кальцію можуть знижувати протонний градієнт, стимулюючи транзиторне відкриття МПТП і, таким чином, запобігати надмірній генерації АФК, у чому власне і буде полягати фізіологічна функція МПТП. Крім того, мітохондріальний  $\text{Ca}^{2+}$  може активувати ферменти антиоксидантного захисту (каталазу, супероксиддисмутази, глутатіон), знижуючи в такий спосіб продукцію АФК [22].

Таким чином, ми встановили, що адаптація до фізичного навантаження супроводжується зменшенням чутливості сердець до утворення МПТП під дією  $\text{Ca}^{2+}$ , що може бути зумовлено активацією синтезу NO і системи UCP. Імовірно, всі клітинні механізми, котрі спрямовані на стабілізацію проникності мітохондріальних мембран роблять свій внесок у загальний захисний ефект, що спостерігається при адаптації до фізичного навантаження.

## ВИСНОВКИ

1. Фізичні навантаження плаванням протягом 4 тиж супроводжувалися покращенням функції ізольованого серця щурів і зменшенням загальної кількості метаболітів, що вивільняються з міокарда у перфузійній розчин.

2. Фізичні навантаження плаванням збільшували експресію UCP3, але не UCP2 у серці.

3. Фізичні навантаження запобігали кальційіндукованому вивільненню мітохондріального фактора, здійснюючи стабілізуючий вплив на мембрани мітохондрій, що був опосередкований синтезом оксиду азоту і ймовірно активацією системи UCP.

4. Експресія UCP2/3 різко зменшувалась у відповідь на збільшення концентрації іонів кальцію у перфузійному розчині як у тренуваних, так і нетренуваних тварин, що дає змогу стверджувати про їх участь у регуляції кальцієвого гомеостазу.

5. Модель кальцієвого навантаження ізольованого серця може слугувати тестом для титрування транзиторної провідності мітохондріальних мембран *in situ*.

*Робота виконана в рамках програми підтримки пріоритетних для держави наукових досліджень (Державний реєстраційний номер роботи 0120U001281).*

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

**Ю.В. Гошовская, Н.А. Струтинская, В.Ф. Сагач**

## **ВЛИЯНИЕ Кальциевой НАГРУЗКИ НА ОБРАЗОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПОР *IN SITU* И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ РАЗОБЩАЮЩИХ БЕЛКОВ В СЕРДЦЕ ТРЕНИРОВАННЫХ КРЫС**

На модели изолированного по Лангендорфу сердца изучали влияние кальциевой нагрузки (от 1,7 до 15 ммоль/л в перфузате) на сократительную активность, высвобождение митохондриального фактора (как маркера образования митохондриальных пор транзиторной проводимости, МПТП) и экспрессию генов разобщающих белков UCP2/3 у нетренированных и тренированных плаванием крыс. Обнаружили, что улучшение функции изолированного сердца тренированных плаванием течение 4 нед крыс сопровождалось увеличением экспрессии UCP3, но не UCP2. Постепенное увеличение концентрации кальция в перфузате вело к приросту сократительной функции, более выраженного у тренированных крыс. Однако 10 ммоль/л и более высокие концентрации кальция приводили к аритмии и резкого снижения сократительной функции изолированного сердца, что больше проявлялось у нетренированных крыс. Физические нагрузки предотвращали кальцийиндуцированное выделение митохондриального фактора, осуществляя стабилизирующее влияние на мембраны митохондрий, которое нивелировалось блокатором синтеза оксида азота (L-NAME). Обнаружили кальцийчувствительный характер экспрессии генов UCP: увеличение мРНК UCP3 при 5 ммоль/л кальция и резкое снижение экспрессии UCP2/3 при 12,5 ммоль/л как у тренированных, так и нетренированных животных, что позволяет утверждать их участие в регуляции кальциевого гомеостазу. Наши результаты указывают, что модель кальциевой нагрузки изолированного сердца может служить тестом для титрования МПТП *in situ*, а активация UCP при



тренировках может играть защитную роль при увеличении внеклеточного кальция, вместе с оксидом азота ингибируя образование МПТП.

Ключевые слова: сердце; оксид азота; кальциевая нагрузка; митохондриальные разобщающие белки; митохондриальная пора; тренировки; плавание.

**Yu.V. Goshovska, N.A. Strutynska, V.F. Sagach**

### **EFFECT OF CALCIUM LOAD ON HEART FUNCTION, MPTP OPENING *IN SITU* AND UCP2/3 MRNA EXPRESSION IN THE HEART OF TRAINED RATS**

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv; e-mail: goshovska@biph.kiev.ua*

We have studied the effect of calcium load (1.7 to 15 mmol/l in perfusate) on isolated heart function, mitochondrial factor release (as a marker of mitochondrial permeability transition pore, MPTP), and cardiac uncoupling proteins (UCP2/3) mRNA expression in untrained and trained rats (swimming for 4 weeks). It was found that the improvement in the isolated heart function of trained rats was accompanied by an increase in the expression of UCP3, but not UCP2. A gradual increase of the calcium content in the perfusate led to an increase in contractile function, more pronounced in trained rats. However, 10 mmol/l and higher concentration of calcium led to arrhythmia and drastic decrease in contractility of isolated heart more obvious in untrained rats. Swimming course prevented the calcium-induced release of mitochondrial factor exerting a stabilizing effect on mitochondrial membranes which was, however, diminished by a nitric oxide synthesis blocker (L-NAME). We have found that UCPs genes expression is calcium-sensitive: an increase in UCP3 mRNA at 5 mmol of calcium and a sharp decrease in UCP2/3 expression at 12.5 mmol/l of calcium in perfusate in both trained and untrained rats indicating the participation of UCPs in the regulation of calcium homeostasis. Our data suggest that the calcium load may serve as a test for in situ MPTP titration. Activation of UCPs together with up-regulated nitric oxide may play a protective role against increasing extracellular calcium inhibiting MPTP formation during physical trainings.

Key words: heart; nitric oxide; calcium load; mitochondrial uncoupling proteins; mitochondrial permeability transition pore; training; swimming.

### **REFERENCES**

1. Boyman L, Williams GSB, Khananshvil D, Sekler I, Lederer WJ. NCLX: The mitochondrial sodium calcium exchanger. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;59:205-13.
2. Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans.* 2010 Aug 1;38(4):841-60.
3. Bauer TM, Murphy E. Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death.

4. Ong S-B, Dongworth RK, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Role of the MPTP in conditioning the heart - translatability and mechanism. *Br J Pharmacol.* 2015;172(8):2074-84.
5. Sagach VF, Scrosati M, Fielding J, Rossoni G, Galli C, Visioli F. The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and ex vivo. A comparison with vitamin E. *Pharmacol Res.* 2002;45(6):435-9.
6. Goshovska YV, Fedichkina RA, Korneliuk OI, Sagach VF. Endothelial monocyte-activating polypeptide-ii and Proemap/P43 diminish isolated heart function disturbances after ischemia-reperfusion. *Fiziol Zh.* 2018;64(5):7-15. [Ukrainian].
7. Chorna SV, Talanov SO, Strutynska NA, Vavilova GL, Kotsuruba AV, Gaidai NM, et al. The functional state of the rat heart during ischemia-reperfusion, the sensitivity of calcium-induced mitochondrial permeability transition pore opening and the uncoupling protein 3 expression following long exercise training. *Fiziol Zh.* 2010;56(1):13-21. [Ukrainian].
8. Kwong JQ, Molckentin JD. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab.* 2015;21(2):206-14.
9. Nadtochiy SM, Nauduri D, Shimanskaya TV, Sagach VF, Brookes PS. Purine release: a protective signaling mechanism of the mitochondrial permeability transition pore in ischemia. *Fiziol Zh.* 2008;54(6):5-14.
10. Sahach VF, Vavilova HL, Rudyk OV, Strutynska NA. Release of unidentified substances of mitochondrial origin—evidence of mitochondrial permeability transition pore opening in the heart mitochondria of rats. *Fiziol Zh.* 2003;49(5):3-12. [Ukrainian].
11. Azzu V, Jastroch M, Divakaruni AS, Brand MD. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2010;1797(6-7):785-91.
12. Iu.V. Hoshovs'ka. The role of uncoupling proteins in mechanisms of protection from oxidative stress. *Fiziol Zh.* 2015;61(1):91-101. [Ukrainian].
13. Trenker M, Malli R, Fertschaj I, Levak-Frank S, Graier WF. Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniport. *Nat Cell Biol.* 2007;9(4):445-52.
14. Zhang B-X, Ma X, Zhang W, Yeh C-K, Lin A, Luo J, et al. Polyunsaturated fatty acids mobilize intracellular Ca<sup>2+</sup> in NT2 human teratocarcinoma cells by causing release of Ca<sup>2+</sup> from mitochondria. *Am J Physiol Physiol.* 2006;290(5):C1321-33.
15. Huntgeburth M, Tiemann K, Shahverdyan R, Schlüter K-D, Schreckenber R, Gross M-L, et al. Transforming growth factor  $\beta$ 1 oppositely regulates the hypertrophic and contractile response to  $\beta$ -adrenergic stimulation in the heart. *PLoS One.* 2011;6(11):e26628.
16. Stavinoha MA, RaySpellicy JW, Hart-Sailors ML, Mersmann HJ, Bray MS, Young ME. Diurnal variations

- in the responsiveness of cardiac and skeletal muscle to fatty acids. *Am J Physiol Metab.* 2004;287(5):E878-87.
17. Jiang N, Zhang G, Bo H, Qu J, Ma G, Cao D, et al. Upregulation of uncoupling protein-3 in skeletal muscle during exercise: a potential antioxidant function. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(2):138-45.
18. Lu Z, Sack MN. ATF-1 Is a Hypoxia-responsive transcriptional activator of skeletal muscle mitochondrial-uncoupling protein 3. *J Biol Chem.* 2008;283(34):23410-8.
19. Zhou M, Lin B-Z, Coughlin S, Vallega G, Pilch PF. UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Metab.* 2000;279(3):E622-9.
20. Boss O, Samec S, Desplanches D, Mayet M, Seydoux J, Muzzin P, et al. Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *FASEB J.* 1998;12(3):335-9.
21. Bo H, Jiang N, Ma G, Qu J, Zhang G, Cao D, et al. Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: Role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(7):1373-81.
22. Yan Y, Wei C, Zhang W, Cheng H, Liu J. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2006;27(7):821-6.

*Матеріал надійшов до  
редакції 23.09.2020*