УДК 612.172+612.769

С.В. Чорна, С.А.Таланов, Н.А. Струтинська, Г.Л. Вавілова, А.В. Коцюруба, М.І. Гайдай, В.Ф. Сагач

Вплив тривалих фізичних навантажень на зміни функції серця щурів при ішемії–реперфузії, чутливість кальційіндукованої мітохондріальної пори та експресію роз'єднувального білка 3

Досліджували вплив адаптації до фізичних навантажень на показники функціонального стану ізольованого за Лангендорфом серця щурів в умовах ішемії–реперфузії, чутливість кальційіндукованої мітохондріальної пори (МП), а також експресію мітохондріального роз'єднувального білка 3 (UCP3). Отримані результати вказують на позитивний вплив фізичних навантажень на функціональний стан міокарда. Реперфузійні порушення скоротливої функції міокарда та його кисневого обміну були менш виражені у щурів, адаптованих до фізичних навантажень (треновані щури). Показано, що чутливість МП до дії індуктора Ca^{2+} у серці тренованих щурів зменшується порівняно порівняно з контрольними тваринами. Так, у мітохондріях серця тренованих щурів достовірно підвищувалась активність конститутивної NO-синтази (cNOS) майже вдвічі, незначно підвищилась активність індуцибельної NOS відносно контролю, а також збільшився вміст перекису водню. В умовах адаптації до фізичних навантажень експресія UCP3 у мітохондріях серця щурів зменшувалася на 65 % порівняно з контролем, а отже, може відігравати певну роль у складному механізмі адаптаційної реакції серця, що спрямовано в основному на ефективність окисного фосфорилювання в мітохондріях і, як наслідок, на підвищення синтезу аденозинтрифосфату. Таким чином, тривалі фізичні навантаження поліпшують функціональний стан серця (саме його скоротливу функцію), а також збільшують резистентність до реперфузійних ушкоджень, зменшуючи чутливість МП до дії іонів кальцію через підвищення активності мітохондріальної cNOS та синтезу оксиду азоту – ендогенного інгібітора МП.

Ключові слова: фізичні навантаження, серце, ішемія–реперфузія, мітохондріальна пора, оксид азоту, UCP3.

ВСТУП

Тривалі фізичні навантаження передбачають складний комплекс перебудови всіх систем організму, насамперед серцево-судинної та м'язової. Адаптація організму до таких навантажень дає можливість збільшувати в декілька разів насосну функцію серця та суттєво поліпшувати його функціональний стан у хворих на ішемічну хворобу серця. Перебудова організму значною мірою пов'язана насамперед з покращенням скоротливої функції міокарда на клітинному рівні, що супроводжується підвищенням сили та швидкості скорочень кардіоміоцитів. Це зумовлено прискоренням кальцієвих транзієнтів і підвищенням чутливості скоротливих білків до іонів кальцію [21]. З іншого боку, збільшення скоротливої активності міокарда неможливе без його енергетичного забезпечення. У тренованих організмів підвищені потреби у аденозинтрифосфаті (АТФ) значною мірою забезпечуються збільшенням в

© С.В. Чорна, С.А.Таланов, Н.А. Струтинська, Г.Л. Вавілова, А.В. Коцюруба, М.І. Гайдай, В.Ф. Сагач

клітинах кількості мітохондрій внаслідок їх біогенезу та позитивних змін у функціонуванні мітохондрій, що забезпечує їх підвищену здатність синтезувати АТФ [16, 23, 28]. Серед багатьох чинників, які впливають на продуктивність мітохондрій, особливе місце займають такі, що призводять до зміни проникності мембран цих органел, пов'язаної з відкриванням неселективного мегаканалу – мітохондріальної пори – МП та АТФ-залежних калієвих каналів, а також із залученням роз'єднувальних білків (UCP) (від англ. uncouplihg proteins), до підвищення протонної провідності внутрішньої мітохондріальної мембрани.

Існує низка агентів, які впливають на відкривання МП. Найголовніший з них Ca^{2+}, який є її природним індуктором. Серед ендогенних регуляторів МП і багатьох фізіологічних процесів особливої уваги заслуговує оксид азоту (NO), який відіграє важливу роль у механізмах регуляції скоротливої активності міокарда та судин. Дані літератури вказують на те, що надмірний синтез NO, який спостерігається за умов активації індуцибельної кальційнезалежної NO-синтазою (iNOS), призводить до утворення пероксинітриту, що спричиняє відкривання МП. Синтезований in vivo мітохондріальною конститутивною NOS (cNOS) NO пригнічує відкривання МП у серці дорослих щурів [12]. Раніше встановлено, що реперфузійні порушення серця значною мірою залежать від чутливості МП до індукторів її відкривання [5, 15].

Є відомості про залучення білків сімейства UCP, зокрема UCP2 і UCP3, до багатьох фізіологічних і патологічних процесів. Розлади у їх функціонуванні та зміни рівнів експресії цих білків виявляють при різних захворюваннях, в тому числі при ішемічно–реперфузійних порушеннях серця [1]. Відомо також, що у разі хронічної серцевої недостатності та інших ушкоджень підвищується вміст UCP3 [26, 27]. Тривалі фізичні навантаження та старіння індукують у серці збільшення рівнів експресії, зокрема, UCP2 відносно базального [9, 10]. Вважають, що мітохондріальні UCP2 і UCP3 – необхідні складові ішемічної толерантності [24].

Проте нині ще недостатньо досліджені молекулярні механізми дії тривалих фізичних навантажень, що впливають на функціональний стан серця, та участь в регуляції зміни чутливості МП щодо дії її модуляторів – внутрішньоклітинного Ca^{2+} та ендогенного NO – та ролі UCP3, які забезпечують помірну протонну провідність внутрішніх мітохондріальних мембран, у кардіопротекторному механізмі.

Мета нашої роботи – дослідити показники функціонального стану ізольованого серця дорослих щурів, його реакцію на ішемію–реперфузію, а також чутливість кальційіндукованої МП та експресію UCP3 у серці щурів в умовах дії тривалих фізичних навантажень.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Вістар віком 6 міс з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

Тварин було поділено на дві групи: 1-ша – інтактні (контрольні) тварини, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України; 2-га – тварини, які підлягали тривалим дозованим фізичним навантаженням (надалі – треновані щури), що здійснювали примусове плавання п'ять днів на тиждень протягом 6 тиж за описаною схемою [7].

Дослідження показників функціонального стану серця. Скоротливу функцію серця вивчали на ізольованих за методом Лангендорфа серцях [13]. Перфузію коронарних судин здійснювали ретроградно через аорту з постійним тиском 75–80 мм рт. ст. при 37^0 С розчином Кребса–Хензеляйта такого складу (ммоль/л): NaCl – 118,

KCl – 4,7, $MgSO_4$ – 1,2, $NaHCO_3$ – 24; KH_2PO_4 – 1,2, глюкоза – 10, $CaCl_2$ – 2,5; pH 7,4. Перфузійний розчин безперервно аерували карбогеном (95 % O_2 і 5 % CO_2). У порожнину лівого шлуночка вставляли поліетиленовий балончик, з'єднаний з тензодатчиком. Після періоду стабілізації серця та зняття вихідних значень показників проводили 30-хвилинну ішемію за допомогою повного перекривання перфузійного потоку з наступною реперфузією впродовж 40 хв. Стан скоротливої функції міокарда оцінювали за змінами значень тиску, що розвивав лівий шлуночок (Рлш) та кінцевого діастолічного тиску. Коронарний потік оцінювали за об'ємом перфузійного розчину, який відтікав від серця протягом 1 хв. Для визначення споживання кисню працюючим серцем у вихідному стані та через кожні 10 хв реперфузії вимірювали парціальний тиск кисню у перфузійному розчині, що притікав і відтікав від серця, за допомогою газоаналізатора BMS-3 Mk 2 ("Radioometer", Данія). Роботу серця розраховували як добуток частоти скорочень на тиск, що розвивається, а кисневу вартість роботи серця – як відношення поглинання кисню до роботи.

Дослідження відкривання МП. Видалені серця промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl. Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування в нашій модифікації [4]. Дослідження відкривання МП проводили за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів. Для цього ізольовані мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, трі-HCl – 25, KH_2PO_4 – 3, pH 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при λ=520 нм за 3 хв до і впродовж 15 хв їх набухання за наявності індуктора іонів кальцію в інкубаційному середовищі. Концентрація білка в цьому середовищі становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі без індуктора з наступною реєстрацією оптичної густини протягом 15 хв.

Біохімічні дослідження конститутивної та індуцибельної NO-синтази в мітохондріях серця щурів. В ізольованих мітохондріях серця визначали активність cNOS, iNOS за допомогою кількості новоутвореного цитруліну [3], а вміст H_2O_2 в мітохондріях – за раніше описаними методами [3].

Експресія UCP3 в серці щурів при дії фізичних навантажень. Рівень експресії білка UCP3 визначали за допомогою Western-blott-аналізу. Гель-електрофорез білків суспензії мітохондрій серця проводили в 10%-му поліакриламідному гелі за наявності додецилсульфату Na за методом Леммлі в камері Hoefer miniVE ("Amersham", США) як описано нами раніше [6]. Використовували первинні моноклональні антитіла до UCP3 ("Sigma", США) у розведенні 1:500 та вторинні антикролячі імуноглобуліни, кон'юговані з пероксидазою хрону ("Sigma", США) у розведенні 1:4000. Кількісний розрахунок отриманих імуноблотів проводили їх сканування та обробки за допомогою комп'ютерної програми GelPro.

Отримані результати оброблені статистичними методами з використанням програми Origin 6.0 (Microcall Inc, США). Достовірність визначали за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тренованих щурів спостерігали достовірне збільшення Рлш – 187,2 мм рт. ст. ± 15,0 мм рт. ст. порівняно з контрольними тваринами, у яких значення цього показника становило 149,9 мм рт. ст. ± 6,5 мм рт.ст. (рис. 1,а). Враховуючи те, що в умовах ізоволюлічного скорочення міокарда, що спостерігаємо на моделі ізольованого за Лангендорфом серця, вказаний показник є позитивним силовим індексом скоротливої активності міокарда. Його суттєве

збільшення у тренованих тварин свідчить про вищий рівень скоротливої активності міокарда, що є характерною відзнакою цих тварин і свідчить про їх адаптацію до фізичних навантажень [21]. Це також підтверджується меншою реакцією їх сердець на ішемію–реперфузію.

Проведено порівняння фізіологічних показників скоротливої активності та кисневого забезпечення діяльності серця до та після ішемії–реперфузії ізольованих сердець контрольних і тренованих щурів. Результати експериментів свідчать про підвищення ефективності роботи серця тренованих тварин у відповідь на розвиток реперфузійного впливу на цей орган. У тварин контрольної групи через 5 хв реперфузії Рлш зменшувався на 39,6 % ± 2,8 %, а після фізичних навантажень – на 15,2 % ± 3,8 % порівняно з вихідним значенням.

Кінцевий діатолічний тиск через 5 хв реперфузії у контрольних щурів становив 53,5 ± 10,6, а у тренованих – 47,6 мм рт. ст. ± 11,7 мм рт. ст. (див. рис. 1,б). Через 40 хв реперфузії його значення були 48,6 мм рт. ст. ± 7,7 мм рт. ст. у контрольних і 28,1 мм рт. ст. ± 6,9 мм рт. ст. – у тренованих тварин.

Швидкість коронарного потоку у тренованих тварин до ішемії становила 12,3 мл/

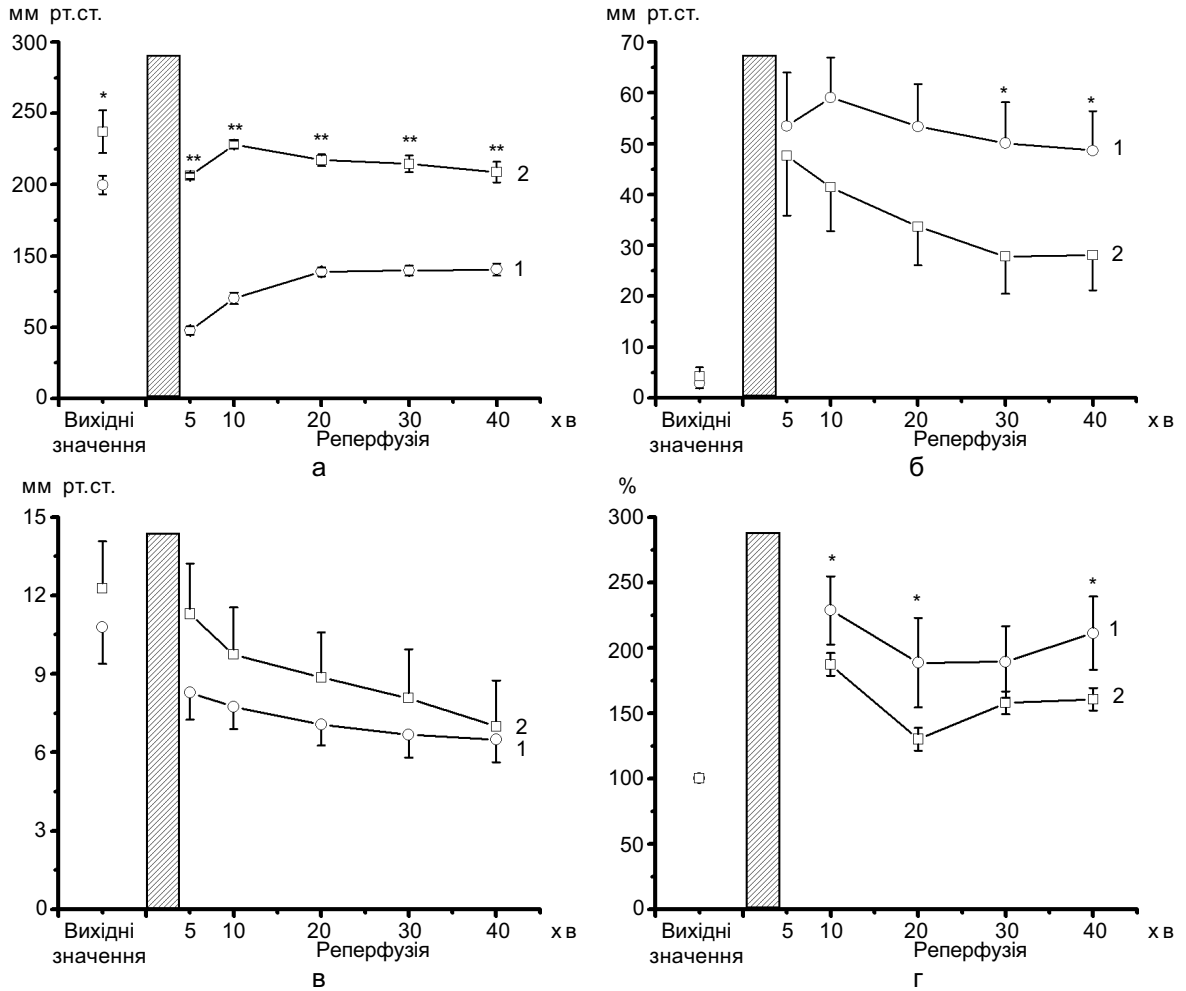

Рис.1. Зміни тиску, що розвивався лівим шлуночком (а), кінцевого діастолічного тиску (б), коронарного потоку (в) і кисневої вартості роботи сердець (г) контрольних (1; n=10) та тренованих (2; n=7) щурів при ішемії – реперфузії. * P<0,05, ** P<0,001 порівняно з контролем

хв ± 1,8 мл/хв, а у контрольних щурів – 10,8 мл/хв ± 1,4 мл/хв (див. рис. 1,в). Впродовж реперфузії серця цей показник поступово знижувався у щурів обох груп. Однак протягом усіх часових проміжків реперфузії швидкість коронарного потоку тренованих тварин перевищувала контрольні значення.

Використання міокардом кисню є важливим показником ефективності роботи дихального ланцюга мітохондрій, що супроводжується утворенням активних форм кисню, надмірна кількість яких призводить до апоптозу кардіоміоцитів і порушення функціонального стану серця.

Ми спостерігали підвищення споживання кисню міокардом при реперфузії (див. рис. 1,г). Однак киснева вартість роботи серця у тренованих тварин була нижчою протягом усіх часових проміжків реперфузії порівняно з контрольними щурами. На 10-й хвилині реперфузії серця цей показник у контрольних тварин збільшувався на 128,7 % ± 26,1 %, тоді як у тренованих тварин – на 87,3 % ± 8,7 % відносно вихідних значень.

Отримані результати свідчать про позитивний вплив фізичних навантажень на функціональний стан серця. При цьому спостерігається не тільки покращення його скорочувальної функції, а й збільшення стійкості серця до ішемічно-репефузійних ушкоджень.

Як показано раніше [2], реакція на ішемію–реперфузію значною мірою зумовлена і залежить від відкривання МП. У зв'язку з цим для пояснення покращення функції ізольованого серця при ішемії–реперфузії за умов впливу на щурів тривалих фізичних навантажень, доцільно було провести серію експериментів in vitro на ізольованих мітохондріях серця тренованих щурів щодо зміни проникності мітохондріальних мембран і пов'язаного з цим відкривання МП. Тому ми досліджували вплив тривалих фізичних навантажень на кальційіндуковане набухання мітохондрій.

Набухання мітохондрій, ізольованих із серця тренованих щурів суттєво не відрізнялася від контролю. Однак за умов дії природного індуктора МП Ca^{2+} в концентрації 10^{-4} моль/л спостерігали зменшення на 33 % значень цих показників у тренованих тварин порівняно з контрольними (рис. 2,а). Попередня інкубація мітохондрій з класичним інгібітором відкривання МП циклоспорином А (10^{-5} моль/л) за умов дії Ca^{2+} в концентрації 10^{-4} моль/л попереджала їх набухання у тварин обох груп.

Залежність набухання мітохондрій серця від іонів кальцію в діапазоні концентрацій 10^{-7}–10^{-4} моль/л контрольних і тренованих щурів представлено на рис. 2,б. Показано, що мітохондрії серця тренованих щурів набухали значно менше у порівнянні з контрольними щурами за наявності кальцію в концентрації 10^{-5} і 10^{-4} моль/л; різниця між величинами набухання становила 33 і 37 % відповідно. Таким чином, показано, що чутливість мітохондрій до дії індуктора – іонів кальцію в концентрації 10^{-5} і 10^{-4} моль/л у серці тренованих щурів зменшується порівняно з контролем.

За останні роки доведено, що відкривання МП пов'язано як з активністю глікогенсинтази кінази 3β [19, 20], так і мітохондріальної NOS, а також зі вмістом оксиду азоту [8, 12]. У дослідах на мітохондріях серця тренованих щурів було показано достовірне підвищення майже вдвічі активності cNOS відносно контролю (6,02 ± 0,08 і 3,64 пмоль · $хв^{-1}$ · $мг^{-1}$ ± 0,27 пмоль · $хв^{-1}$ · $мг^{-1}$ білка відповідно; $P \leq 0,05$). Раніше в експериментах на ізольованому за Лангендорфом серці та ізольованих мітохондріях з використанням нітропрусиду натрію (донора NO), L-NAME та аміногуанідину (інгібіторів NOS) була показана кардіопротекторна дія оксиду азоту в умовах ішемії–реперфузії, яка реалізувалась інгібуванням кальційіндукованого набухання мітохондрій [8]. Було встановлено, що у межах концентрацій від 10 нмоль до 1 мкмоля, що за фізіологічних умов синтезується cNOS, NO пригнічував відкривання МП [11]. Отже, за умов впливу тривалих

фізичних навантажень оксид азоту, синтезований мітохондріальною cNOS, може виступати як ендогенний інгібітор МП.

Поряд з цим у тренованих тварин достовірно незначно підвищувалася активність iNOS в мітохондріях серця відносно контролю (3,07 ± 0,21 і 1,73 пмоль · хв$^{-1}$ · мг$^{-1}$ ± 0,24 пмоль . хв$^{-1}$. мг$^{-1}$ білка відповідно; $P \leq 0,05$). Отримані результати дають можливість припустити, що помірна активація iNOS спричиняє певний регуляторний вплив щодо чутливості кальційіндукованого відкривання МП за умов дії тривалих фізичних навантажень.

У тренованих щурів незначно, але достовірно підвищувався вміст H_2O_2 (2,49 пмоль/мг білка ± 0,18 пмоль/мг білка) в мітохондріях серця у порівнянні з контролем (1,52 пмоль/мг білка ± 0,10 пмоль/мг білка; $P \leq 0,05$), що може свідчити про досить високий рівень генерації супероксид-аніона за цих умов. За даними літератури підвищений вміст H_2O_2 може активувати функціонування антиоксидантної ферментної системи [25].

Таким чином, при дії тривалих фізичних навантажень у мітохондріях серця щурів підвищується активність cNOS на тлі незначного зростання активності iNOS, а також вміст H_2O_2, що пояснює роль NO в ендогенних механізмах захисту щодо відкривання МП.

На функціонування мітохондрій і відкривання МП може мати суттєвий вплив вміст UCP. Незважаючи на великий інтерес до білків UCP2 та UCP3, що експресуються в серці, нині молекулярні механізми їх біохімічної та фізіологічної функцій повною мірою не з'ясовані. Існує мало відомостей щодо ролі UCP3, який розглядають як важливу складову в системі антиоксидантного захисту, що сприяє оптимізації роботи серця за умов досягнення максимальної ефективності енергетичного метаболізму при одночасній мінімізації індукованого тренуваннями оксидативного стресу [10]. Тому для кращого розуміння ролі UCP3 у функціонуванні серця, необхідні дослідження зміни експресії цього білка поряд з вивченням його фізіологічних функцій. Отже, метою наступного етапу роботи було дослідити вплив тривалих фізичних навантажень на рівень експресії UCP3 у серці щурів.

За допомогою Western-blott-аналізу у мітохондріях серця контрольних і трено-

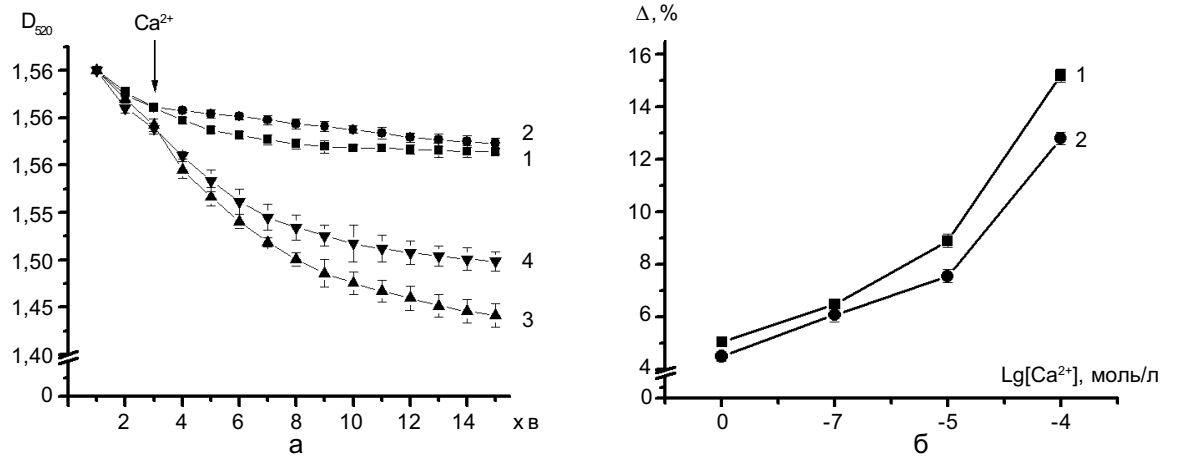

Рис.2. Зміни чутливості мітохондріальної пори до індуктора її відкривання кальцію в серці щурів (n=5): а – набухання мітохондрій в умовах дії індуктора Ca^{2+}: 1 – контроль; 2 – треновані щури; 3 – контрольні щури і дія Ca^{2+}; 4 – треновані щури і дія Ca^{2+}; б – концентраційна залежність різниці величини набухання за наявності іонів кальцію мітохондрій серця контрольних (1) та тренованих (2) щурів; (Δ% – різниця між величиною набухання мітохондрій на 15-й хвилині і вихідним значенням оптичної густини цієї суспензії на 1-й хвилині)

ваних щурів було встановлено рівні експресії UCP3 (рис. 3,а). Показано, що мітохондрії серця контрольних щурів мають певний базальний вміст цього роз'єднувального білка. За умов дії тривалих фізичних навантажень рівень експресії UCP3 у мітохондріях серця зменшувався на 65 % порівняно з контролем.

Дані літератури щодо експресії UCP3 за умов дії гострих і хронічних фізичних навантажень суперечливі. Останнім часом доведено, що фізичні тренування за допомогою плавання збільшують вміст UCP3 у скелетних м'язах щурів [18]. Поряд з цим рівні експресії м-РНК UCP3 скелетних м'язів були вищими відносно базального його рівня за умов індукованого тренуваннями оксидативного стресу [17].

Тим не менш, є дослідження, які свідчать, що експресія UCP3 істотно нижче в м'язах тренованих осіб у порівнянні з контролем [22]. Так, нещодавно показано зниження експресії як UCP3, так і стану 4 дихання після певного періоду тривалого тренування [13, 22]. Довготривалі помірні тренування викликають помітне зниження експресії UCP3 в скелетних м'язах, у той час як в умовах гострого режиму тренування відбувається суттєве збільшення експресії UCP3 [18]. Таким чином, експресія UCP3 може змінюватися залежно від режимів фізичної активності (одноразові гострі чи хронічні тренування тощо).

Отже, тривалі фізичні навантаження сприяють підтриманню низького рівня експресії UCP3 у дорослих тренованих щурів у порівнянні з базальним рівнем цього білка контрольних тварин. Можливо це є наслідком уповільнення мітохондріального дихання в стані 4 за умов підвищеного оксидативного стресу, який супроводжує процес фізичного навантаження [6]. Беручи до уваги той факт, що за умов дії фізичних навантажень відбувається надекспресія UCP2 в мітохондріях серця [10], а також згідно з нашими результатами щодо зниження рівня експресії UCP3 у цьому органі у вищевказаних умовах, можна припустити, що ці білки, ймовірно, забезпечують процес врівноваження загальної пасивної протонної провідності внутрішніх мітохондріальних мембран. Тому зниження рівня експресії UCP3 за умов дії тривалих фізичних навантажень може відігравати певну роль у складному механізмі адаптаційної реакції серця, що, можливо, спрямовано в основному на підвищення ефективності окисного фосфорилювання в мітохондріях і, як наслідок, на підвищення синтезу АТФ для забезпечення скоротливої функції серця.

Таким чином, тривалі фізичні навантаження можуть сприяти: 1) поліпшенню функціонального стану серця, а саме його скоротливої функції, а також підвищенню резистентності органу до оксидативного стресу за умов реперфузійних ушкоджень; 2) зниженню чутливості МП до дії індуктора іонів кальцію в концентрації 10^{-5} і 10^{-4} моль/л в серці щурів; 3) підвищенню активності мітохондріальної cNOS, що забезпечує в достатній кількості синтез оксиду азоту, який може виступати як ендогенний інгібітор МП.

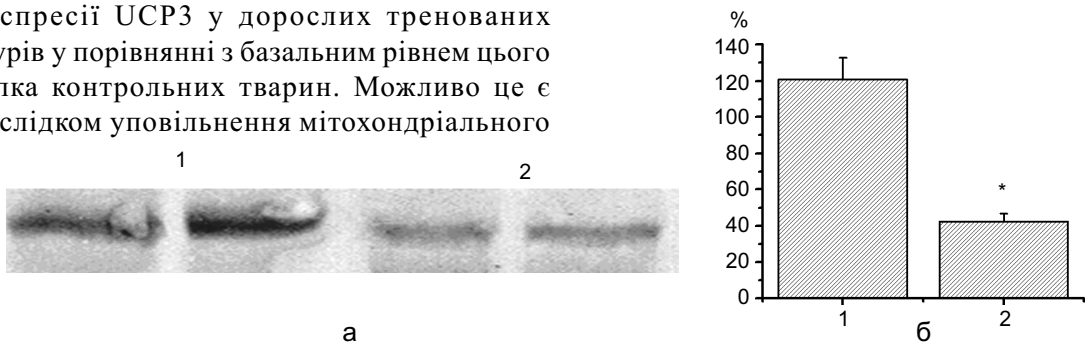

Рис. 3. Експресія UCP3 (34 кДа) (а) та її відносні показники (б) в мітохондріях серця контрольних (1) та тренованих (2) щурів (n=4). * P<0,05– різниця достовірна порівняно з контролем

С.В. Черная, С.А. Таланов, Н.А. Струтинская, Г.Л. Вавилова, А.В. Коцюруба, Н.М. Гайдай, В.Ф. Сагач

ВЛИЯНИЕ АДАПТАЦИИ К ФИЗИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ НА ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИИ СЕРДЦА КРЫС ПРИ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ, ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КАЛЬЦИЙИНДУЦИРОВАНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ И ЭКСПРЕССИЮ РАЗОБЩАЮЩЕГО БЕЛКА 3

Исследовали влияние адаптации к физическим нагрузкам на показатели функционального состояния изолированного по Лангендорфу сердца крыс при ишемии–реперфузии, чувствительность кальцийиндуцированной митохондриальной поры, а также экспрессию митохондриального разобщающего белка 3 (UCP3). Полученные результаты указывают на положительное влияние физических нагрузок на функциональное состояние сердца. Реперфузионные нарушения сократительной функции миокарда и его кислородного обмена были менее выражены у крыс, адаптированных к физическим нагрузкам (тренированные крысы). Показано, что чувствительность МП к действию индуктора Ca^{2+} в сердце тренированных крыс уменьшается по сравнению с контрольными животными. Так, в митохондриях сердца тренированных крыс было достоверное повышение активности cNOS почти вдвое, незначительное повышение активности iNOS относительно контроля, а также незначительное увеличение содержания H_2O_2. В условиях адаптации к физическим нагрузкам уровень экспрессии UCP3 в митохондриях сердца крыс уменьшался на 65 % по сравнению с контролем. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что уменьшение уровня экспрессии UCP3 в условиях адаптации животных к физическим нагрузкам может играть определенную роль в сложном механизме адаптационной реакции сердца, что, возможно, направлено в основном на эффективность окислительного фосфорилирования в митохондриях и, как следствие, на повышение синтеза АТФ. Таким образом, адаптация к физическим тренировкам способствует улучшению функционального состояния сердца, а именно его сократительной функции, а также повышению резистентности к реперфузионным повреждениям, снижая чувствительности МП к действию ионов кальция путем повышения активности митохондриальной cNOS и синтеза оксида азота – эндогенного ингибитора МП.

Ключевые слова: физические нагрузки, сердце, ишемия–реперфузия, митохондриальная пора, оксид азота, UCP3.

S.V. Chorna, S.O. Talanov, N.A. Strutynska, G.L. Vavilova, A.V. Kotsuruba, N.M. Gaidai, V.F. Sagach

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

The effect of long exercise training on the indexes of the functional state isolated by Lanhendorf rat hearts during ischemia-reperfusion, the sensitivity of calcium-induced mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening as well as the mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) expression were investigated. The obtained results indicate the positive effect of long exercise training on the heart functional state. Reperfusion injurings of the heart contractile function and its myocardial oxygen metabolism were less pronounced in adapted to exercise loading rats (trained rats). It was shown that the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening to its inductor Ca^{2+} in the trained rats heart decreased compared with control animals. Thus, in the trained rat heart mitochondria had a significant increase in cNOS activity (almost twice), slight increase in the iNOS activity compared with control, and a slight increase in the hydrogen peroxide level. Under adaptation to the long exercise training, the expression level of UCP3 in rat heart mitochondria was reduced by 65 % compared with the control. These results suggest that the decrease in the expression level of UCP3 in the adaptation of animals to exercise training may play the certain role in the complex mechanism of adaptive response of the heart, that may be aimed mainly on the efficiency of oxidative phosphorylation in mitochondria and, consequently, to increase in the ATP synthesis. Thus, long exercise training contributes to the improvement of the heart functional state, namely, its contractile function, and also increases the resistance to reperfusion injury, reducing the sensitivity of the MPTP opening to the action of calcium ions by increasing the activity of mitochondrial constitutive NOS and synthesis of nitric oxide, an endogenous inhibitor of MPTP opening.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences 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. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Рудик О.В. та ін. Інгібування мітохондріальної пори як один із механізмів кардіопротекторної дії коензиму Q_{10} // Там само. – 2007. – **53**, №4. – С. 35–42.
3. Сагач В.Ф., Рудик О.В., Вавілова Г.Л. та ін. Мелатонін відновлює ішемічну толерантність та зменшує чутливість відкриття мітохондріальної пори в серці старих щурів // Там само. – 2006. – **52**, №3. – С.3–14.
4. Сагач. В.Ф., Вавілова Г.Л., Рудик О.В., Струтинська

Н.А. Вивільнення не ідентифікованих речовин мітохондріального походження – показників відкриття мітохондріальної пори серці щурів // Там само. – 2003. – **49**, №5 – С.3–12.

5. Сагач. В.Ф., Шиманская Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час репрфузії ішемізованого серця може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // Там само. – №4 – С.6–12.
6. Струтинська Н.А., Тімощук С.В., Вавілова Г.Л. та ін. Експресія UCP3 і чутливість мітохондріальної пори до індуктора Ca^{2+} у серці старих щурів за умов активації біосинтезу коензиму Q // Там само. – 2009. – **55**, № 3. – С.44–54.
7. Таланов С.А., Бурый В.А., Сагач В.Ф. Влияние адаптации к дозированным физическим нагрузкам на функцию миокарда крыс // Нейрофизиология. – 2009. – **41**, № 1 – С.41–47.
8. Шиманская Т.В., Добровольский Ф.В., Вавилова Г.Л. и др. NO-зависимая модуляция чувствительности открытия митохондриальной поры при ишемии/ реперфузии изолированного сердца // Рос. физиол. журн. – 2009. – **95**, № 1 – С.28–37.
9. Barazzoni R., Nair K.S. Changes in uncoupling protein-2 and -3 expression in aging rat skeletal muscle, liver, and heart // Amer. J. Physiol. Endocrimol. Met. – 2001. – **280**, №3. – P.413–419.
10. Bo H., Jiang N., Ma G. 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. and Med. – 2008. – **44**, №7. – 1373–1381.
11. Brookes P.S., Salinas E.P., Darley-Usmar K. et al. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, № 27. – P. 20474–20479.
12. Dedkova E.N., Blatter L.A. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase // J Physiol. – 2009. – **587**. – P. 851–872.
13. Doring H.J. The isolated perfused heart according to Langendorff technique-function—application // Physiol. Bohemoslov. – 1990. – 39, №6. – P.481–504.
14. Fernstrцm M., TonkonogiM., Sahlin K. Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle // J. Physiol. – 2003. – **554**, №3. –P.755–763.
15. Hausenloy D., Wynne A., Duchen M., Yellon D. Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection // Circulation. – 2004. – **109**, №14. – P.1714–1717.
16. Holloszy J.O. Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4// J. Physiol. Pharmacol. – 2008. – **59**. Supl. 7. – P.5–18.
17. Jiang N., Zhang G., Bo H., Qu J. et al. Upregulation of uncoupling protein-3 in skeletal muscle during exercise: a potential antioxidant function // Free Radic. Biol. and Med. – 2009. – **46** – P. 138–145.
18. Jones T. E., Baar K., Ojuka E. et al. Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis // Amer. J. Physiol. Endocrinol. and Metabol. – 2003. –**284**. – P. E96–E101.
19. Juhaszova M., Zorov D. B., Kim S.H. et al. Glycogen synthase kinase-3в mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore // J. Clin. Invest. – 2004. – **113**, №11 – P.1535–1549.
20. Juhaszova M., Zorov D. B., Yaniv Y. et al. Role of glycogen synthase kinase-3в in cardioprotection // Circul. Res. – 2009. – **104**. №11 – P.1240–1252.
21. Kemi O.J., Ellingsen O., Smith G.L., Wisloff U. Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes // Front Biosci. – 2008. – **13**. – P.356–368.
22. Ljubicic V., Adhihetty P.J., Hood D.A. Role of UCP3 in state 4 respiration during contractile activity-induced mitochondrial biogenesis // J. Appl. Physiol. – 2004. – **97**. – P. 976–983.
23. McConnell G.K., Wadley G.D. Potential role of nitric oxide in contraction-stimulated glucose uptake and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2008. – **35**. – P.1488–1492.
24. McLeod C.J., Aziz A., Hoyt R.F. et al. Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia // J. Biol. Chem. – 2005. – **280**, №39. – P.33470–33476.
25. Moran M., Delgado J., Gonzalez B. et al. Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training // Acta Physiol. Scand. – 2004. – **180**, №2. – P.157–166.
26. Murray A.J., Cole M.A., Lygate C.A. et al. Increased mitochondrial uncoupling proteins, respiratory uncoupling and decreased efficiency in the chronically infarcted rat heart // J. Mol. and Cell. Cardiol. – 2008. – **44**. – P.694–700.
27. Nabben M., Hoeks J. Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac- and skeletal muscle metabolism // Physiol. and Behavior – 2008. – **94**. – P. 259–269.
28. Rimbaud S., Garnier A., Ventura-Clapier R. Mitochondrial biogenesis in cardiac pathology // Pharmacol. Rep. – 2009. – **61**. – P.131–138.

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: snizhana-chorna@inbox.ru

Матеріал надійшов до редакції 16.09.2009