

ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ.О.О.БОГОМОЛЬЦЯ  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

ПАНАСЮК ОЛЬГА СЕРГІЇВНА

УДК 577.115.3+576.311.347

**ВПЛИВ СКЛАДОВИХ ФОСФОЛІПІДІВ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН  
ЕНДОТЕЛІЮ І МІТОХОНДРІЙ СЕРЦЯ**

Спеціальність 03.00.13 — фізіологія людини та тварин

подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  
Панасюк О.С.

Науковий керівник **Мойбенко Олексій Олексійович**,  
академік НАН України, доктор медичних наук, професор  
**Бондаренко Олександр Іванович**  
кандидат біологічних наук

Київ — 2021

## АНОТАЦІЯ

**Панасюк О.С. Вплив складових фосфоліпідів на функціональний стан ендотелію і мітохондрій серця.** — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.13 «Фізіологія людини і тварин» — Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця, НАН України, Київ, 2021.

Дисертація присвячена дослідженню впливу омега-3 поліненасичених жирних кислот (омега-3 ПНЖК) та лізофосфоліпідів (ЛФЛ) на функціонування мітохондрій міокарда та ендотелію судин аорти та з'ясуванню можливих механізмів, які забезпечують кардіопротекторний вплив цих сполук.

В роботі виявлено особливості впливу терапії омега-3 ПНЖК на чутливість мітохондріальної пори до кальцієвого перенавантаження двох функціонально та структурно гетерогенних фракцій мітохондрій міокарда. Результати дослідження свідчать, що інтерфібрилярна (ІФ) та субсарколемальна (СС) фракції мітохондрій в умовах контролю проявляють однакову чутливість до кальційіндукованого набухання. Встановлено, що терапія щурів препаратом «Епадол», що містить омега-3 ПНЖК впродовж 4 тижнів, зменшує чутливість мітохондріальної пори до кальційіндукованого відкриття обох мітохондріальних фракцій міокарда. Встановлено, що протекторний ефект терапії омега-3 ПНЖК значно більш виражений для інтерфібрилярної, ніж для субсарколемальної фракції мітохондрій, вказуючи на те, що функціональна роль мітохондріальної гетерогенності зростає при патологічних станах, які супроводжуються кальцієвим перенавантаженням.

В роботі також досліджено вплив омега-3 ПНЖК на функціонування інтерфібрилярної та субсарколемальної фракцій мітохондрій міокарда щурів за умов ізопротереноліндукованого ураження міокарда. Показано, що за таких умов, застосування омега-3 ПНЖК запобігає набуханню мітохондрій серця, зокрема більш виражений їх вплив на ІФ фракцію мітохондрій.

При реєстрації мітохондріального дихання встановлено, що швидкість дихання в метаболічному стані (МС) 3, дихальний контроль та ефективність фосфорилування достовірно відновлювались у щурів з ізопротереноловим пошкодженням при застосуванні омега-3 ПНЖК. Підтверджено, що ін'єкції ізопротеренолу змінюють показники дихання мітохондрій при окисненні сукцинату; швидкість дихання в МС-4 за таких умов не змінювалась.

Для з'ясування механізмів, що забезпечують захисну дію омега-3 ПНЖК на функцію міокарда і судин, досліджено їх вплив на електричні властивості ізольованих мітохондрій та ендотеліальних клітин. В експериментах на ізольованих мітопластах (мітохондрії без зовнішньої мембрани) за допомогою методу петч-кламп в конфігурації «mitoplast-attached» продемонстрована поодинокі активність кальційзалежних калієвих каналів великої провідності (ВКСа-канали) (~300 пС), яка підсилювалась після додавання  $3 \cdot 10^{-6}$  М докозагексаєнової кислоти (ДГК) (ПНЖК класу омега-3) у зовнішній розчин. Амплітуда струмів через поодинокі канали при цьому не змінювалась. Подальше додавання паксиліну, селективного блокатора ВКСа-каналів, та хелатування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в зовнішньому розчині призводило до значного пригнічення активності поодиноких каналів, що свідчить про залучення ВКСа-каналів внутрішньої мітохондріальної мембрани в реалізацію ефекта ДГК.

Концентраційнозалежне підсилення активності поодиноких ВКСа-каналів продемонстровано при додаванні ДГК до внутрішньої поверхні плазматичної мембрани ендотеліальних клітин лінії EA.hy926. Підсилення активності відбувалося при позитивних та негативних підтримуваних потенціалах. ДГК викликала гіперполяризацію ендотеліальних клітин, що свідчить про стимуляцію кальційзалежних процесів. Після видалення мембранного холестерину за допомогою метилциклодекстрину, додавання ДГК не призводило до стимуляції активності ВКСа-каналів.

Досліджено вплив складових фосфоліпідів на функціональну активність ВКСа-каналів, експресованих в лінії клітин ендотеліального походження EA.hy926. Продемонстровано, що лізофосфатидилхолін (ЛФХ) та

лізофосфатидилінозитол (ЛФІ) мають пряму модулюючу дію на активність ВКСа-каналів, гіперполяризуючи ендотеліальні клітини. Крім того, ЛФХ та ЛФІ пригнічують гіперполяризацію ендотеліальних клітин, індуковану дією ендотелій-залежних вазодилаторів гістаміна та ацетилхоліна (Ац). Такий ефект спостерігається за рахунок пригнічення натрій-кальцієвого обмінника.

**Ключові слова:** омега-3 ПНЖК, мітохондрії, ізопротеренол, лізофосфатидилхолін, лізофосфатидилінозитол, ВКСа-канали, ендотеліальні клітини

## SUMMARY

### **Panasiuk O.S. The effect of phospholipid components on the functional state of the endothelium and heart mitochondria.**

The dissertation for the degree of a Candidate of Biological Sciences (PhD) in the specialty 03.00.13 "Human and animal physiology" — Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2021. — Manuscript.

The dissertation is devoted to investigation of the influence of omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFA) and lysophospholipids (LPL) on the function and signaling of myocardial mitochondria and vascular endothelium.

The differences in the effects of omega-3 PUFA therapy on the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening elicited by  $\text{Ca}^{2+}$  overload between the two functionally and structurally heterogeneous fractions of myocardial mitochondria were revealed in the work. The results of the study indicate that the interfibrillar (IF) and subsarcolemmal (SS) fractions of mitochondria have the same sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced swelling. Four weeks treatment of rats with Epadol containing 45% omega-3 PUFA, was found to reduce the sensitivity of MPTP to calcium-induced opening of both myocardium mitochondrial fractions. It was found that the protective effect of omega-3 PUFA therapy is much more pronounced for the IF than for the SS fraction of mitochondria, indicating that the functional role of mitochondrial heterogeneity increases under pathological conditions accompanied by  $\text{Ca}^{2+}$  overload.

The effect of omega-3 PUFA-enriched diet on the functioning of IF and SS fractions of rat myocardial mitochondria under isoproterenol-induced myocardial damage was also studied. It is shown that under such conditions, omega-3 PUFA-enriched diet prevents  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondria swelling, pointing for protective effect of omega-3 PUFA on isoproterenol-induced heart damage. This effect was found to be more pronounced for the IF mitochondrial fraction, When studying mitochondrial respiration, it was found that in mitochondria isolated from rats with isoproterenol-evoked myocardial damage, the respiration rate in state 3, the respiratory control and

phosphorylation efficiency were significantly restored by omega-3 PUFA-enriched diet. Isoproterenol injections have been shown to result in altered mitochondrial respiration during succinate oxidation: respiration rate in state 4 under such conditions did not change significantly. The ability of mitochondria to respond to the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  in the group with omega-3 PUFA was also restored.

To elucidate the mechanisms providing the protective effect of omega-3 PUFA on myocardial and vascular function, their effects on the electrical properties of isolated mitochondria and endothelial cells (EC) were investigated. In patch-clamp experiments on isolated mitoplasts (mitochondria without an outer membrane), single channel activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent potassium channels of big conductance (BKCa) was demonstrated. The channel activity was increased by the administration of  $10^{-5}$  M docosahexaenoic acid (DHA), a member of omega-3 PUFA, to the external solution. No change was observed in single-channel current amplitudes. Addition of paxilin, a selective blocker of BKCa channels, and chelation of  $\text{Ca}^{2+}$  in the extracellular solution led to a significant inhibition of the channel activity, indicating the involvement of BKCa channels of the inner mitochondrial membrane in the effect of DHA.

Addition of DHA elicited hyperpolarization of endothelial cells. In patches excised from endothelial cells, the addition of DHA to the inner membrane surface enhanced the BKCa single channel activity in a concentration-dependent manner. After removal of membrane cholesterol with methylcyclodextrin, the addition of DHA did not stimulate the activity of BKCa channels.

In excised inside-out patches, lysophosphatidylcholine (LPH) and lysophosphatidylinositol (LPI) were shown to stimulate the BKCa channel activity. EC hyperpolarized in response to these compounds, however, inhibited the hyperpolarization to histamine and acetylcholine, the effect mediated by inhibition of the sodium-calcium exchanger.

**Key words:** omega-3 PUFA, mitochondria, isoproterenol, lysophosphatidylcholine, lysophosphatidylinositol, BKCa channels, endothelial cells

**НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ  
РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:**

**Статті у фахових виданнях**

1. **Panasiuk O**, Shysh A, Bondarenko A. Omega-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet differentially protects two subpopulations of myocardial mitochondria against Ca<sup>2+</sup>-induced injury. *Experimental & Clinical Cardiology*. 2013; 18(1):e60. *(Особистий внесок здобувачки: особисто налагоджено метод виділення двох мітохондріальних фракцій міокардіальних клітин і проведено виділення мітохондрій для подальших експериментів, проведення всіх експериментальних досліджень, статистична обробка результатів, участь в плануванні дослідів та в підготовці матеріалів статті до публікації)*
2. **Panasiuk OS**, Shysh AM, Moïbenko OO. The influence of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on functional parameters of myocardial mitochondria during isoproterenol-induced heart injury. *Fiziologichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine)*. 2014; 60(1):18-24. *(Особистий внесок здобувачки: проведення всіх експериментальних досліджень, статистичної обробки результатів дослідження, участь в підготовці матеріалів статті до публікації)*
3. **Panasiuk O**, Bondarenko AI. Membrane cholesterol determines the stimulatory effect of omega-3 PUFA on BK channel activity. *Pharmacologia*. 2015;6(1):31-37. *(Особистий внесок здобувачки: виконано частину експериментальних досліджень, участь в обговоренні та написанні статті)*
4. **Панасюк ОС**, Шиш AM, Мойбенко OO. Омега-3 поліненасичені жирні кислоти нормалізують функцію мітохондрій, ферментів про- та антиоксидантної системи та експресію цитохрому P450 2E1 при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця. *Фізіол. журн*. 2016;62(2):64-71. *(Особистий внесок здобувачки: виконано всю експериментальну частину на мітохондріях, написання частини статті, присвяченій мітохондріям)*
5. Bondarenko A, Montecucco F, **Panasiuk O**, Sagach V, Sidoryak N, Brandt KJ, Mach F. GPR55 agonist lysophosphatidylinositol and lysophosphatidylcholine

inhibit endothelial cell hyperpolarization via GPR-independent suppression of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> refilling. *Vascular pharmacology*. 2017/2/28;89:39-48. *(Особистий внесок здобувачки: виконано частину експериментальних досліджень, участь у підготовці матеріалів до друку)*

6. **О.С. Панасюк**, О.І. Бондаренко. Участь кальційзалежних калієвих каналів великої провідності в модуляції параметрів дихання мітохондрій міокарда докозагексаєновою кислотою. *Фізіол. журн.* 2020;66(6): 74-81. *(Особистий внесок здобувачки: виконано частину експериментальних досліджень, участь у підготовці матеріалів до друку і написанні статті)*

#### ***Додаткові роботи, у яких висвітлено результати дисертації***

7. **Panasiuk OS**, Shysh AM, Moibenko OO. Effects of dietary ω-3 polyunsaturated fatty acids on myocardial mitochondria functioning under isoproterenol-induced heart damage. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*. 2015;6(1) *(Особистий внесок здобувачки: проведення експериментальних досліджень, статистичної обробки результатів дослідження, участь в підготовці матеріалів статті до публікації)*
8. **Panasiuk OS**, Shysh AM, Dosenko VE, Moibenko OO. Omega-3 polyunsaturated fatty acids normalize the functions of mitochondria, pro-and antioxidant enzymes of, and cytochrome P450 2e1 expression after isoproterenol-induced myocardial injury. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*. 2017;8(2) *(Особистий внесок здобувачки: виконано експериментальну частину на мітохондріях, участь в підготовці матеріалів до друку)*

#### **Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. **Panasiuk O**, Moibenko O. Different sensitivities of two mitochondrial subpopulations to calcium-induced injury after omega-3 PUFA feeding. 2nd International Graz symposium on lipid and membrane biology: focus on lipotoxicity. 2008 March 13-15; Graz, Austria. *(Публікація тез, участь у постерній сесії)*.



2. **Panasiuk O**, Moybenko O. Interfibrillar mitochondria in  $\omega$ -3 PUFA-fed rats exhibit a higher resistance to calcium than subsarcolemmal ones. J of Mol Cel Cardiol. 2008;44(4):806 (*Публікація тез*).
3. **Панасюк ОС**, Шиш АМ, Мойбенко ОО. Омега-3 поліненасичені жирні кислоти попереджають набухання субсарколемальної та інтерфібрилярної фракцій мітохондрій міокарда. VI конг. патофізіол. України; 2012 3-5 жовт., Місхор, Україна. Таврический медико-биологический вестник. 2012;15(3), Ч.1(59):254-256. (*Публікація тез*).
4. **Panasiuk O**. Different sensitivities of two mitochondrial subpopulations to calcium-induced injury. 2nd MiP summer school on mitochondrial respiratory physiology. 2008 July 12-18; Schröcken, Vorarlberg, Austria. (*Публікація тез*).
5. **Панасюк ОС**, Шиш АМ, Мойбенко ОО. Вплив омега-3 поліненасичених жирних кислот на показники функціонування мітохондрій міокарда при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця. Матер. VI пленуму наук. т-ва патофізіол. України та наук.-практ. конф. за участю міжнар. спеціалістів "Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології". 2014:71-73. (*Публікація тез*).
6. Bondarenko A, **Panasiuk O**, Okhai I, Brandt KJ, Montecucco F, Mach F. Alterations of IKCa-mediated endothelial electrical signaling in a murine model of atherosclerosis. European journal of clinical investigation. 2017/5/1 47;129-129. (*Публікація тез, участь у постерній сесії*).
7. Shysh A.M., **Panasiuk O.S.**, Maksymchuk O.V., Dosenko V.E. The influence of omega-3 polyunsaturater fatty acids on mitochondria swelling, enzymes of prooxidant-antioxidant system and expression of cytochrome P450 2E1 after isoproterenol-induced myocardial injury // 5-й з'їзд Українського тов. клітинної біології з міжн. представництвом. 2-6 жовтня 2016. Одеса. - P28. (*Публікація тез*)

## ЗМІСТ

		Стр.
<b>АНОТАЦІЯ</b>		<b>2</b>
<b>ПЕРЕДІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ</b>		<b>14</b>
<b>ВСТУП</b>		<b>16</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>		<b>24</b>
<b>1.1.</b>	<b>ХАРАКТЕРИСТИКА МІТОХОНДРІЙ МІОКАРДА В НОРМАЛЬНИХ УМОВАХ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ</b>	<b>24</b>
1.1.1.	Характеристика окисного фосфорилування мітохондрій	24
1.1.2.	Субпопуляції мітохондрій міокарда	26
1.1.3.	Роль іонів кальцію в фізіології мітохондрій	27
1.1.3.1.	Цикл кальцію в мітохондріях	27
1.1.3.2.	Вплив Ca <sup>2+</sup> на функцію мітохондрій при нормальних умовах	28
1.1.3.3.	Вплив кальцію на окисне фосфорилування мітохондрій при патології	28
1.1.3.5.	Різниця в чутливості двох фракцій мітохондрій до Ca <sup>2+</sup> -ПНВ	29
1.1.4.	Мітохондріальна пора перемінної проникності	29
1.1.4.1.	Молекулярна композиція МППП	31
1.1.4.2.	Регуляція МППП	31
1.1.4.3.	Значення МППП	32
1.1.5.	Вплив ізопротеренолу на функціонування мітохондрій серця	32
1.1.6.	Іонні канали мітохондрій	34
1.1.6.1.	Цикл K <sup>+</sup> в мітохондріях, наслідки його входу в мітохондрії	34
1.1.6.2.	Вплив ВКСа-каналів на дихання мітохондрій	36
<b>1.2.</b>	<b>ВПЛИВ ОМЕГА-3 ПНЖК НА ФУНКЦІОНУВАННЯ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ (МІТОХОНДРІЇ ТА ЕНДОТЕЛІЙ СУДИН)</b>	<b>36</b>
1.2.1.	Структура ПНЖК. Хімічна структура омега-3 ПНЖК: альфа-ліноленова, ейкозапентаєнова, докозагексаєнова. Кардіоліпін.	36

1.2.2.	Вплив омега-3 ПНЖК на потенціал мітохондрій	39
1.2.3.	Вплив омега-3 ПНЖК на дихання мітохондрій	39
1.2.4.	Вплив ПНЖК на МППП	39
1.2.5.	Вплив ПНЖК на утворення АФК	39
1.2.6.	Вплив ПНЖК на іонні канали мітохондрій	39
1.2.7.	Вплив ПНЖК на функціонування ендотелію	42
1.2.8.	Вплив лізофосфоліпідів на функціонування ендотелію	42
<b>Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b>		<b>44</b>
<b>2.1.</b>	Експериментальні тварини	44
<b>2.2.</b>	Експериментальні розчини та середовище для культивування клітин	46
<b>2.3.</b>	Препарат аорти	46
<b>2.4.</b>	Виділення фракцій мітохондрій з міокарда щурів.	48
<b>2.5.</b>	Реєстрація поглинання кисню ізольованими мітохондріями.	48
<b>2.6.</b>	Метод спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій.	51
<b>2.7.</b>	Електрофізіологічні вимірювання	51
<b>2.9.</b>	Статистичний аналіз експериментальних результатів.	55
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>		<b>56</b>
<b>3.1.</b>	<b>ВПЛИВ ОМЕГА-3 ПНЖК НА ВЛАСТИВОСТІ МІТОХОНДРІЙ МІОКАРДА</b>	<b>56</b>
3.1.1.	Контрольна група: ІФ та СС мітохондрії мають подібну чутливість до $Ca^{2+}$	56
3.1.2.	Годування омега-3 ПНЖК знижує чутливість МППП до $Ca^{2+}$ СС і ІФ фракцій мітохондрій міокарда щурів	56
3.1.3.	Захисна дія омега-3 ПНЖК більш виражена в ІФ фракції мітохондрій	60
<b>3.2.</b>	<b>СПОЖИВАННЯ ОМЕГА-3 ПНЖК ЗНИЖУЄ ЧУТЛИВІСТЬ</b>	<b>62</b>

	МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ПОРИ ДО КАЛЬЦІЙЗАЛЕЖНОГО ПЕРЕХОДУ В СТАН ВИСОКОЇ ПРОНИКНОСТІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІЗОПРОТЕРЕНОЛ-ІНДУКОВАНОМУ ПОШКОДЖЕННІ МІОКАРДА	
3.2.1.	Показники дихання мітохондрій міокарда при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця щурів. Вплив споживання омега-3 ПНЖК	62
3.2.2.	Набухання субсарколемальних та інтерфібрилярних мітохондрій при експериментальному ізопротереноліндукованому пошкодженні міокарда за умов споживання омега-3 ПНЖК	65
3.3.	ОМЕГА-3 ПНЖК ЗБІЛЬШУЮТЬ АКТИВНІСТЬ ВКСa-КАНАЛІВ ВНУТРІШНЬОЇ МЕМБРАНИ МІТОХОНДРІЙ КАРДІАЛЬНИХ КЛІТИН HL-1	68
3.4.	ЗАЛУЧЕННЯ ВКСa-КАНАЛІВ В ЕФЕКТАХ ОМЕГА-3 ПНЖК НА ПАРАМЕТРИ ДИХАННЯ МІТОХОНДРІЙ МІОКАРДА ПРИ ВИСОКИХ КОНЦЕНТРАЦІЯХ КАЛЬЦІУ	70
3.5.	МЕМБРАННИЙ ХОЛЕСТЕРИН ЗУМОВЛЮЄ СТИМУЛЮЮЧИЙ ЕФЕКТ ОМЕГА-3 ПНЖК НА АКТИВНІСТЬ ВКСa-КАНАЛІВ	77
3.5.1.	Докозагексаєнова кислота гіперполяризує ендотеліальні клітини завдяки стимуляції ВКСa-каналів	77
3.5.2.	ДГК збільшує активність ВКСa-каналів ендотеліальних клітин незалежно від рецепторів	78
3.5.3.	Стимулюючий ефект ДГК на функцію ВКСa-каналів детермінується мембранним холестерином	80
3.6.	ЛІЗОФОСФАТИДИЛІНОЗИТОЛ ТА ЛІЗОФОСФАТИДИЛХОЛІН ІНГІБУЮТЬ ГІПЕРПОЛЯРИЗАЦІЮ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН ЧЕРЕЗ GPR-НЕЗАЛЕЖНЕ	82

	<b>ПРИГНІЧЕННЯ Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-ОБМІННИКА</b>	
3.6.1.	Лізофосфатидилхолін викликає гіперполяризацію ендотеліальних клітин внаслідок активації ВКСа -каналів	82
3.6.2.	ЛФІ та ЛФХ оборотно інгібують гіперполяризацію ендотеліальних клітин на гістамін	83
3.6.3.	ЛФІ та ЛФХ пригнічують прямий і зворотній режим Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -обмінника незалежно від GPCR та супероксид аніонів	85
<b>РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ</b>		<b>94</b>
<b>ВИСНОВКИ</b>		<b>108</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>		<b>110</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДФ	аденозиндифосфорна кислота
АК	аденілаткіназа
АЛК	альфа-ліноленова кислота
АНТ	аденіннуклеотидтрансфераза
АТФ	аденозинтрифосфорна кислота
АФК	активні форми кисню
Ац	ацетилхолін
БСА	бичачий сироватковий альбумін
ВЖК	вільні жирні кислотм
ВММ	внутрішня мітохондріальна мембрана
ДГК	докозагексаєнова кислота
ДК	дихальний контроль
ЖК	жирні кислоти
ЗММ	зовнішня мітохондріальна мембрана
ЕГК	ейкозагексаєнова кислота
ЕПК	ейкозапентаєнова кислота
ЕК	ендотеліальні клітини
ЕПР	ендоплазматичний ретикулум
ЕТЛ	електрон транспортний ланцюг
ІМ	інфаркт міокарда
ІФМ	інтерфібрилярні мітохондрії
КАТФ	АТФ залежні калієві канали
Кл	кардіоліпін
ЛПНЩ	ліпопротеїни низької щільності
ЛФІ	лізофосфатидилінозитол
ЛФХ	лізофосфатидилхолін
ЛФЛ	лізофосфоліпиди
МППП	мітохондріальна пора перемінної провідності
МКУ	мітохондріальний кальцієвий уніпортер

МЦД	метил- $\beta$ -циклодекстрин
НАД	нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
ОКФОС	окисне фосфорилування
ПНЖК	поліненасичені жирні кислоти
ПКА	протеїн кіназа А
РР	ріанодинові рецептори
СОД	супероксиддисмутаза
СПР	саркоплазматичний ретикулум
ССЗ	серцево-судинні захворювання
ССМ	субсарколемальні мітохондрії
ФАД	флавінаденіндинуклеотид
ФЛ	фосфоліпіди
цАМФ	циклічний аденозин монофосфат
ЦТК	цикл трикарбонових кислот
ВКСа	калієві канали великої провідності
Ca <sup>2+</sup> -ПНВ	кальцієве перенавантаження
EDHF	( <b>endothelium-derived hyperpolarizing factor</b> ) гіперполяризуючий фактор ендотеліального походження
GPCR120	( <b>G<sub>i/o</sub> protein-coupled receptor 120</b> ) білокспряжений рецептор 120
ІКСа	калієві канали середньої провідності
ICAM-1	( <b>inter-cellular adhesion molecule 1</b> ) молекула міжклітинної адгезії 1
NMDG	N-Methyl-D-glucamine
Рно	фосфор неорганічний
SKCa	калієві канали малої провідності
SOCE	( <b>store operated calcium entry</b> ) депозалежний вхід кальцію
VCAM-1	( <b>vascular cell adhesion molecule 1</b> ) васкулярна молекула клітинної адгезії 1
VDAC	( <b>voltage dependent anion channel</b> ) потенціалзалежний аніонний канал

## ВСТУП

### Актуальність теми

Серед надзвичайного різноманіття ліпідних сполук, що входять до складу біологічних мембран, фосфоліпіди (ФЛ) — їх ключовий компонент. Хоча формування стабільної двошарової молекулярної мембранної структури могло би бути забезпечене одним чи двома різновидами фосфоліпідів, але адаптивність мембран до зовнішньоклітинного середовища стає можливою лише за наявності широкого спектру ліпідних сполук у їх складі. Надзвичайна різноманітність до 2000 видів ФЛ визначається специфічністю структури та функційних властивостей їх полярних груп голівок та жирнокислотних залишків. При дії фосфоліпази А<sub>2</sub> з гліцерофосфоліпідів утворюються лізофосфоліпіди та вільні жирні кислоти (ЖК), після чого ці сполуки можуть поєднуватись в нових комбінаціях.

Серцевосудинні захворювання (ССЗ) — обширна гетерогенна група хвороб, що вражають серце та судини. Серед них особливу позицію посідає інфаркт міокарда (ІМ) — ураження серцевого м'яза, викликане гострим порушенням його кровопостачання. ІМ є захворюванням глобального масштабу, та однією з основних причин смертності; його поширеність зростає, тому очевидно, що пошуки шляхів ефективного запобігання даної патології є надзвичайно важливими. Відомо, що найбільш частою причиною ішемічної хвороби серця є атеросклероз коронарних артерій на тлі дисліпідемії.

Давно помічено, що споживання таких ЖК, як омега-3 ПНЖК, спричиняє позитивний вплив на виникнення та тяжкість ССЗ [1]. Хоча механізми, які забезпечують захисний вплив омега-3 ПНЖК на судини і серцевий м'яз, до кінця не з'ясовані, літературні дані свідчать, що подібний захист може пояснюватись в значній мірі не лише дією даних кислот на плазматичну мембрану клітин міокарда, але й впливом на мітохондрії міокарда та на судинний ендотелій; останній бере активну участь в регуляції кровопостачання тканин. В той же час слід мати на увазі, що ЖК легко абсорбуються та поширюються по всіх тканинах тіла, в тому числі в серцево-судинній системі.



Необхідно визнати, що механізми впливу омега-3 ПНЖК на мітохондріальний апарат серця та судин поки що недостатні. Зокрема, потребують детального вивчення відповідні механізми впливів на судинний ендотелій, який відіграє ключову роль у регуляції судинного тонуусу та кровопостачання серця.

В регуляції функціонального стану мітохондрій важливу роль відіграє мітохондріальна пара перемінної проникності (МППП) і розуміння механізмів її регуляції викликає величезний науково-практичний інтерес [2, 3, 4], проте роль цих субклітинних функційних структур в реалізації захисної дії омега-3 ПНЖК на сьогодні до кінця не з'ясована.

Відомо також, що в серцевому м'язі є дві функціонально різні субпопуляції мітохондрій — субсарколемальні та інтерфібрілярні, проте роль функціональної гетерогенності мітохондрій міокарда в нормі та при патології поки не з'ясована. І хоча ІФ фракція досягає 80% від загального вмісту мітохондрій, більшість досліджень на ізольованих мітохондріях, виконано тільки на СС фракції. Очевидно, що дослідження ролі двох фракцій мітохондрій серця та особливостей їх сигналізації в реалізації захисної дії омега-3 ПНЖК за різних патологічних станів, зокрема ІМ, є актуальним питанням фізіології та патофізіології.

Пошук шляхів фармакологічної регуляції функцій мітохондрій та мітохондріального метаболізму є актуальною проблемою сучасної фізіології, оскільки оптимізація їх функцій може відігравати значну роль в попередженні ушкоджень міокарда. Фармакологічна індукція ІМ ізопротеренолом у щурів є зручною моделлю подібної патології з досить низькою смертністю тварин. Можлива захисна роль омега-3 ПНЖК щодо попередження пошкодження мітохондрій (зокрема порушення окисного фосфорилування і кальційіндукованого набухання) при ізопротереноліндукованому пошкодженні серцевого м'язу поки не досліджена. Особливо це стосується різних фракцій мітохондрій — субсарколемальної та інтерфібрілярної.

Досить тривалий час активація мітохондріальних та сарколемальних АТФ-залежних калієвих (КАТФ) каналів вважалась основним кардіопротекторним механізмом і чимало робіт присвячено дослідженню кардіозахисної дії активаторів КАТФ-каналів [5, 6]. Крім КАТФ каналів, в серцевому м'язі є й інші типи  $K^+$ -каналів, зокрема  $Ca^{2+}$ -залежні  $K^+$ -канали великої провідності, наявність яких нещодавно була підтверджена на внутрішній мембрані мітохондрій серця [7]. Результати найновіших досліджень свідчать про залучення мітохондріальних ВКСа-каналів у механізми кардіопротекції під час ішемічно-реперфузійного пошкодження серця [8, 10]. Тому визначення механізмів впливу омега-3 ПНЖК на функціональний стан мітохондрій та ролі ВКСа-каналів в омега-3 ПНЖК-опосередкованій сигналізації в мітохондріях і ендотеліальних клітинах є важливим для розширення сучасних уявлень щодо механізмів кардіопротекції та визначення альтернативних молекулярних мішеней в процесі пошуку нових терапевтичних підходів у кардіозахисті.

Здатність омега-3 ПНЖК відігравати протекторну роль в різних аспектах ендотеліальної дисфункції викликала інтерес до ідентифікації молекулярних механізмів, що лежать в основі цих ефектів. Функції ендотеліальних клітин та мітохондрій регулюються їх електричними реакціями (значною мірою такими, що або безпосередньо детермінуються транспортом іонів кальцію через мембрану, або істотно впливають на цей процес). Визначення безпосереднього ефекту омега-3 ПНЖК щодо функції іонтранспортних механізмів ендотеліальних клітин та мітохондрій в нормі та при патології є важливою метою для розуміння механізмів, якими омега-3 ПНЖК впливають на функцію серцево-судинної системи.

Щодо другого компонента фосфоліпідів, який утворюється при від'єднанні від них омега-3 ПНЖК, а саме лізофосфоліпідів, то їх фізіологічна роль до кінця не з'ясована. Ці сполуки широко відомі як група прозапальних ліпідів, задіяних в патогенез атеросклероза. Деякі лізофосфатидилхоліни можуть бути діагностичними маркерами ІМ. ЛФЛ довгий час розглядали тільки як мембранний компонент для синтезу різноманітних ФЛ та заякорення білків в мембрани, але зараз відомо про групу біоактивних ЛФЛ з гормоноподібними

сигнальними властивостями. У той же час повідомлялося, що ЛФЛ здатні забезпечувати потужний нейропротекторний ефект [9]. Серед усього різноманіття ЛФЛ, лізофосфатидилхолін та лізофосфатидилінозитол виділяються на даний час завдяки своїм вазоактивним властивостям, складній фармакології та фізіологічному значенню. Але відомості щодо впливів ЛФХ та ЛФІ на вазомоторні властивості судин та судинну сигналізацію залишаються суперечливими. Запропоновано різні гіпотези відносно механізмів дії ЛФХ на ендотелійзалежну релаксацію. Отже, у сукупності механізми, що лежать в основі як стимулювання, так і пригнічення ендотелійзалежного розслаблення при дії ЛФЛ, досі не розкриті.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Роботу виконано в рамках тем НДР відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України: «Системні та молекулярно-генетичні дослідження механізмів розвитку гіпертрофії та недостатності серця» (№ 0110U004753) та «Дослідження механізмів ремоделювання міокарда в патогенезі розвитку серцевої недостатності та її корекції» (№ 0114U007233).

Робота була виконана за часковою підтримкою австрійського наукового фонду (FWF, номер гранту P27238-B27) та швейцарського національного наукового фонду (SNSF, номер гранту IZ73Z0\_152578).

**Метою** дисертаційної роботи було визначення механізмів впливу складових фосфоліпідів на функціональний стан ендотеліальних клітин і мітохондрій серця експериментальних тварин.

Для досягнення зазначеної мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Виявити можливі особливості впливу тривалого споживання омега-3 ПНЖК на  $Ca^{2+}$ -індуковане відкриття мітохондріальних пор перемінної проникності субсарколемальної та інтерфібрилярної фракцій мітохондрій.

2. З'ясувати можливі відмінності у чутливості МППП до переходу в стан високої провідності в субсарколемальній та інтерфібрилярній фракціях мітохондрій міокарда щурів при експериментальному інфаркті міокарда у щурів.
3. Виявити та охарактеризувати вплив тривалого споживання омега-3 ПНЖК на чутливість МППП щодо їх переходу в стан високої провідності у субсарколемальній та інтерфібрилярній фракціях мітохондрій та на параметри дихання мітохондрій серця щурів при експериментальному інфаркті міокарда.
4. Визначити безпосередній вплив омега-3 ПНЖК на електричні реакції внутрішньої мембрани мітохондрій серцевих клітин.
5. З'ясувати можливу участь мітохондріальних ВКСа-каналів в регуляції параметрів дихання мітохондрій міокарда під впливом омега-3 ПНЖК.
6. Визначити безпосередній вплив омега-3 ПНЖК та біологічно активних фосфоліпідів лізофосфатидилінозиту та лізофосфатидилхоліну на електричні реакції ендотеліальних клітин.

**Об'єкт дослідження:** ендогенні механізми кардіопротекції.

**Предмет дослідження:** індукція та інгібування мітохондріальних пор; мітохондріальне дихання; функціональна активність ВКСа-каналів.

#### **Методи дослідження.**

Для досягнення поставленої мети були використані наступні підходи: препаративної *біохімії* (виділення мітохондрій методом диференціального центрифугування), *біофізичні методи* (визначення відкриття МППП за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання органел серця за наявності індукторів; реєстрація дихання мітохондрій з використанням електроду Кларка; петч-кламп у конфігурації «whole-cell», «inside-out», «mitoplast-attached»; статистичні методи аналізу числових даних.

#### **Наукова новизна отриманих результатів.**

Отримані результати свідчать, що інтерфібрилярна та субсарколемальна фракції мітохондрій в умовах контролю проявляють приблизно однакову

чутливість до кальційіндукованого набухання, проте захисний ефект омега-3 ПНЖК є значно більш вираженим щодо мітохондрій інтерфібрилярних, ніж щодо субсарколемальних мітохондрій.

Вперше показано, що застосування омега-3 ПНЖК запобігає набуханню мітохондрій та зниженню ефективності дихання останніх в серці в умовах ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда. Вперше порівняно дві фракції мітохондрій при ізопротереноліндукованому пошкодженні. Виявлений захисний ефект омега-3 ПНЖК при ізопротереноліндукованому пошкодженні серцевого м'яза був більш виражений щодо ІФ мітохондрій при набуханні.

Встановлено деталі молекулярних механізмів кардіопротекторного впливу омега-3 ПНЖК. Показана роль мітохондріальних та ендотеліальних ВКСа-каналів в кардіопротекції при дії омега-3 ПНЖК. Експериментально продемонстровано, що докозагексаєнова кислота (ДГК), ПНЖК класу омега-3, при її дії на внутрішню мітохондріальну мембрану кардіальних клітин збільшує активність ендогенно експресованих мітохондріальних ВКСа-каналів, не змінюючи амплітуди струму через поодинокі канали. Продемонстровано, що ДГК викликає гіперполяризацію ендотеліальних клітин внаслідок стимуляції ендотеліальних ВКСа-каналів (ефект, що потенціює ендотелійзалежне розслаблення судин). Вперше експериментально продемонстровано, що чутливість ВКСа-каналів до омега-3 ПНЖК залежить від рівня мембранного холестерину.

Досліджено також вплив лізофосфоліпідів (біологічно активних ліпідів, що утворюються з фосфоліпідів під дією фосфоліпази А2) на активність ВКСа-каналів. В експериментах на лінії ендотеліальних клітин EA.hy926 продемонстровано, що такі лізофосфоліпідиди, як лізофосфатиділхолін та лізофосфатиділінозітол, посилюють активність ВКСа-каналів. Цей ефект призводить до гіперполяризації ендотеліальних клітин. Крім того, ЛФХ та ЛФІ пригнічують гіперполяризацію ендотеліальних клітин, викликану дією ендотелійзалежних вазодиліаторів (гістаміну та ацетилхоліну). Такий вплив реалізується за рахунок пригнічення натрій-кальцієвого обмінника. Цей механізм дії ЛФІ та ЛФХ може обумовлювати пригнічення ендотелійзалежної релаксації.

**Теоретичне значення** данної наукової роботи полягає в тому, що її результати відкривають певні перспективи для продовження експериментального та теоретичного вивчення механізмів зв'язку між ВКСа-каналами та механізмами кардіозахисту за допомогою омега-3 ПНЖК.

**Практичне значення.** Визначення механізмів впливу омега-3 ПНЖК на функціональний стан мітохондрій та ролі ВКСа-каналів в омега-3 ПНЖК-опосередкованій сигналізації мітохондрій є важливим для розширення сучасних уявлень щодо механізмів кардіопротекції та визначення альтернативних молекулярних мішеней у процесі пошуку нових терапевтичних підходів в кардіозахисті.

Результати досліджень можуть бути використані для читання лекцій студентам біологічних спеціальностей закладів вищої освіти.

### **Особистий внесок здобувача**

Дисертаном особисто опрацьовано весь обсяг наукової літератури стосовно дисертації, особисто налагоджено метод ізоляції двох мітохондріальних фракцій міокардіальних клітин і проведено ізоляцію мітохондрій для всіх подальших експериментів. Здобувачем особисто виконано весь обсяг експериментальної роботи на ізольованих мітохондріях з подальшою статистичною обробкою і, частково, на культивованих клітинах і ізольованих судинах. Дисертант активно обговорювала отримані результати із керівниками роботи. Інтерпретація отриманих даних і формулювання висновків виконано разом з керівниками роботи.

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення й результати дисертації були представлені та обговорені на таких науково-практичних конференціях та конгресах:

1. 2nd International Graz Symposium on Lipid and Membrane biology: Focus on Lipotoxicity (Грац, Австрія, 13-15 березня, 2008),
2. 28th Meeting of the European Section of the International Society for Heart Research (May 28-31, Athens 2008),

3. VI Нац. Конгрес патофізіологів України з міжнар. участю (Сімферополь-Місхор, Україна, 3-5 жовтня 2012),
4. 2nd MiP Summer School on mitochondrial respiratory physiology (July 12-18, 2008 Schröcken, Vorarlberg, Austria),
5. «Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології» (23-25.09.2014, Вінниця, Україна),
6. 51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (Генуя, Італія, (May 17-19, 2017),
7. 5-й З'їзд Українського тов. клітинної біології з міжн. представництвом (2-6 жовтня, 2016, Одеса, Україна).

### **Публікації**

Матеріали дисертації опубліковані у **13** публікаціях, з яких **6** — статті у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України, **7** — тези доповідей на наукових конференціях.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація складається зі вступу, 4 розділів, висновків, списку використаних джерел, 18 рисунків, 2 таблиць. Основний текст роботи викладено на 110 сторінках. Загальний обсяг роботи становить 133 сторінки. Список цитованих джерел налічує 224 найменування.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ МІТОХОНДРІЙ МІОКАРДА В НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ

Більше мільярду років тому, ендосимбіотична подія між представником  $\alpha$ -протеобактерій та стародавнім мікроорганізмом спричинила, як вважають, еволюцію всього еукаріотичного життя на планеті [11, 12]. Ця бактерія, перетворившись на мітохондрію, стала найбільш ефективним джерелом АТФ для енергетичних потреб еукаріотичної клітини. В кардіоміоцитах, мітохондрії найбільш поширена органела та джерело близько 90% АТФ. Крім того, мітохондрії виконують в клітині інші функції — це місце важливих метаболічних реакцій — синтезу стероїдних гормонів, піримідинів, ліпідів, циклу сечовини, перетворення амінокислот тощо. Також відіграють центральну роль в термогенезі, метаболізмі ксенобіотиків, чутливості до глюкози, регуляції інсуліну, гомеостазі  $\text{Ca}^{2+}$ , генерації активних форм кисню (АФК) та їх знешкодженні, взаємодії з іншими органелами, в деяких шляхах загибелі клітин [12, 13, 14, 15, 16, 17].

Такий широкий спектр функцій в клітині зумовлює важливість мітохондрій для життєдіяльності та виживання клітини, і логічним стала поява та розвиток мітохондріальноопосередкованих терапевтичних підходів, таких як стимулювання мітохондріального біогенезу, метаболічних модуляторів, знешкоджувачів АФК, інгібіторів МППП тощо [18, 12, 17].

Зовнішня мітохондріальна мембрана (ЗММ), подібно до плазматичної мембрани, має високу концентрацію фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну, відношення білків до ліпідів становить 50:50. Внутрішня мітохондріальна мембрана (ВММ) має унікальну композицію фосфоліпідів, дуже схожу на бактеріальну, з відношенням білки:ліпіди 4:1. ВММ складається, головним чином, з фосфатидилхоліну (40%), фосфатидилетаноламіну (30%), кардіоліпіну (15-20%), також є фосфатидилінозитол, фосфатидилсерин та інші ліпідні сполуки, включаючи холестерол. В той час, як ЗММ пориста та вільно пропускає іони та малі незарядженні молекули через пори (потенціалзалежні аніонні канали), ВММ



вільно пропускає кисень та воду. Композиція цих мембран дуже динамічна, особливо спеціалізованої внутрішньої, та суворо регулюється, але може бути змінена ЖК, які надходять з їжею. Біофізична організація мембран мітохондрій надзвичайно важлива, так як вони регулюють рух іонів, метаболітів, малих молекул між цитозолем та матриксом, і будь-який вплив на цю організацію неодмінно призведе до зміни мітохондріальної біоенергетики та гомеостазу клітини [19, 16].

### **1.1.1. Характеристика окисного фосфорилування мітохондрій**

Ефективність мітохондріальної системи окисного фосфорилування (ОКФОС) надзвичайно важлива, так як вона забезпечує більшу частину АТФ клітини. Розуміння контролю ОКФОС необхідне для пояснення фізіологічних, патологічних та фармакологічних змін в мітохондріях [20]. Порушення ОКФОС може бути спричинене недостатнім постачанням субстратів, порушенням структури/функції ферментів ЕТЛ, нестачею електронного переносчика  $Q_{10}$ , кисню при ішемії чи анемії, надлишковою мембранною провідністю для протонів [21].

Пошкодження ОКФОС можуть бути структурними (спадкові та набуті (ішемія)) та функціональними, які трапляються по одному чи в комбінаціях. Роз'єднання ОКФОС через проникність мембрани, зміни мембранних ліпідів або пошкодження білків повинні строго контролюватись.

Багато параметрів, таких як походження мітохондрій або умови їх виділення та вимірювання параметрів дихання (температура, рН, буферний склад), можуть змінювати респіраторний стан. ОКФОС контролюється по-різному в різних тканинах. За [22], м'язи і серце керуються на рівні дихального ланцюга; тоді як печінка, нирки та мозок контролюються переважно на рівні фосфорилування за допомогою АТФ-синтази та фосфатного переносчика.

Виділяють 5 рівнів регуляції ОКФОС [23]:

1. пряма модуляція активності ЕТЛ, через експресію швидких чи повільних ізоформ комплексу IV, модуляції активності комплексу IV мембранним потенціалом, посттрансляційними модифікаціями (фосфорилування, нітросилація). Активація чотирьох мітохондріальних дегідрогеназ іонами кальцію

також залучена в стимуляції ОКСФОС шляхом збільшення постачання НАДН в ЕТЛ;

2. вродженна ефективність ОКСФОС може регулюватись базовою чи індукованою протонною провідністю, рівнем кисню, змінами в організації чи в складі суперкомплексів;

3. динаміка мітохондріальної сітки — залежність ефективності ОКСФОС від морфологічного стану мітохондрій в живій клітині, яка залежить від суворо регульованих процесів поділу та злиття, рухливості мітохондрій та осмотичних явищ набухання та стиснення;

4. регуляція біогенезу та деградації мітохондрій;

5. вплив клітинного та мітохондріального мікрооточення — наявність енергетичних субстратів та їх доставка, взаємодія з іншими органелами (ЕПР, апарат Гольджі, плазматична мембрана), вплив фармакологічних сполук.

Характеристика **станів дихання мітохондрій** наведена в розділі **МЕТОДИ**.

### **1.1.2. Субпопуляції мітохондрій міокарда**

Відомо, що в кардіоміоцитах є дві функціонально різні субпопуляції мітохондрій, локалізованих в різних ділянках клітини: субсарколемальні, розташовані під сарколемою, та інтерфібрилярні, які розташовані між міофібрилами [24, 25, 26]. Хоча інтерфібрилярна мітохондріальна фракція досягає 80% загального мітохондріального вмісту [24, 27], більшість досліджень на ізольованих мітохондріях, виконано на субсарколемальній субпопуляції.

Вважають, що ССМ поставляють АТФ для іонного гомеостазу (канали плазмалеми), в той час як ІФМ забезпечують енергією скоротливий апарат кардіоміоцитів [28].

ІФМ розташовані паралельно до міофібрил, зазвичай витягнуті та довжиною в один саркомер (1,5 — 2мкм), кристи добре розвинені. ССМ мають довжину 0,4 — 3мкм, форма — овальна, сферична, багатокутна, стрижне- та

підковоподібна [29]. Більшість крист ССМ мають ламелярну форму, зрідка тубулярну, тоді як ІФМ мають обидві форми [30, 31].

ІФМ простягаються вздовж саркомерів та оточені саркоплазматичним ретикулумом (СПР). Тобто місцеві зміни концентрації кальцію впливають на функції мітохондрій, і навпаки, мітохондрії можуть регулювати локальну кальцієву сигналізацію [32].

Вміст цитохромів a, b, та c подібний в двох фракціях, вміст кардіоліпіну — вищий в СС фракції [33]. Конексин 43 (білок, який входить до складу щілинних контактів, які забезпечують дифузію низькомолекулярних речовин), локалізований у внутрішній мембрані саме ССМ [34]. Роз'єднуючий білок 3 (білок внутрішньої мембрани мітохондрій, залучений до розсіювання енергії) в більшій кількості міститься також в ССМ [35]. Вміст сфінгомієліну, сфінгозину та сфінганіну (сфінголіпіди, які відіграють роль у згинанні мембрани, її проникності) у двох фракціях приблизно однаковий, але кількість церамідів у СС популяції набагато вищий [36]. Активність цитратсинтази, глутаматдегідрогенази та сукцинатдегідрогензи в 1,5 рази вище у ІФМ ніж у СС, але активність карнітинпальмітоїлтрансферази приблизно однакова у двох фракціях [26]. Дві фракції відрізняються у швидкості окиснення субстратів. ІФМ окиснюють субстрати приблизно в 1,5 рази швидше ніж СС фракція [26, 32, 38, 39, 33, 40, 41].

Стосовно продукції АФК, то ССМ мають вищі показники ніж ІФ, експресія антиоксидантного фермента Mn-SOD не відрізнялась між фракціями [24]. За деякими даними [42], не виявлено різниці в продукції  $H_2O_2$  між фракціями мітохондрій.

### **1.1.3. Роль кальцію в фізіології мітохондрій**

#### **1.1.3.1. Цикл кальцію в мітохондріях**

Під час деполяризації плазматичної мембрани кальцій входить в кардіоміоцити через потенціалзалежні  $Ca^{2+}$ -канали L-типу та спонукає ріанодинові рецептори (RR), які є лігандзалежними кальцієвими каналами розташованими на СПР, до відкриття та вивільняє кальцій з СПР — так зване

кальційіндуковане вивільнення кальцію.  $\text{Ca}^{2+}$  видаляється з цитозолу через 4 головні механізми:  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза СПР, сарколемальний  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмінник, сарколемальна  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза та транспорт кальцію в мітохондріальний матрикс.

Відомі три механізми входу кальцію в мітохондрії в кардіоміоцитах: електрогенний мітохондріальний кальцієвий уніпортер (МКУ), швидкий режим поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  та ріанодинові рецептори на внутрішній мітохондріальній мембрані. Найбільш досліджений шлях — через МКУ, який блокується рутенієм червоним та інгібується роз'єднувачами, будучи потенціалзалежним.

Існують декілька механізмів, що забезпечують екструзію кальцію з мітохондрій:  $\text{Na}^+$ -залежний (переважає у збудливих клітинах (серце)) та  $\text{Na}^+$ -незалежний у незбудливих ( $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник).

Тоді як стаціонарна концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  зумовлена балансом між входом через МКУ (головним чином) та виходом через  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник та ін., тимчасові зміни концентрації кальцію залежать від забуферення в мітохондріальному матриксі [43, 44, 45].

### **1.1.3.2. Вплив $\text{Ca}^{2+}$ на функцію мітохондрій за нормальних умов**

Добре відомо, що біоенергетика мітохондрій та гомеостаз кальцію складно взаємодіють. *In vivo* ці взаємодії ще складніші ніж *in vitro*, та включають інші клітинні органели, наприклад ЕПР та компартменти цитозолу [47].

Загальновідомо про кальцієву чутливість ключових ферментів ЦТК, які включають в себе гліцерол-3-фосфат дегідрогеназу, ізоцитратдегідрогеназу,  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназу та піруватдегідрогеназу [48].

$\text{Ca}^{2+}$  регулює активність дегідрогеназ шляхом фосфорилування: синтез АТФ запускається 3',5'-цАМФ-залежним фосфорилуванням та виключається кальційзалежним дефосфорилуванням [49].

Субодиниця І цитохрому с може активуватись  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним дефосфорилуванням при високих концентраціях  $\text{Ca}^{2+}$  *in vitro*. Активація F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФази кальцієм відбувається через вивільнення інгібіторного білка з F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФази чи посттрансляційними модифікаціями ферментного комплексу [50].

### **1.1.3.3. Вплив кальцію на окисне фосфорилювання мітохондрій**

Швидкість дихання мітохондрій печінки щурів стимулювалась до 70%, коли  $[Ca^{2+}]$  поза мітохондріями зростала з 103 до 820 нМ (субстрат дихання — піруват) [51].

$Ca^{2+}$  в концентрації  $1,25 \cdot 10^{-6}$  М стимулював дихання мітохондрій (субстрат — сукцинат) в МС-3, але не в МС-4, з глутаматом дихання стимулювалось як в МС-3, так і МС-4. Дихальний контроль (ДК) зростав з будь-яким субстратом, так як  $Ca^{2+}$  активував МС-3 сильніше ніж МС-4 [52].

В дослідях на мітохондріях мозку [47],  $Ca^{2+}$  інгібував дихання вже у концентрації  $5 \cdot 10^{-7}$  М, причому інгібування було часо- та концентраційнозалежне.

### **1.1.3.4. Вплив кальцію на окисне фосфорилювання мітохондрій при патології**

Добре задокументовано, що різке зростання рівня мітохондріального  $Ca^{2+}$  (т.з.  $Ca^{2+}$ -перенавантаження (Са-ПНВ)) спричиняє серцеву дисфункцію через загибель кардіоміоцитів. Два ключові механізми, які призводять до пошкодження кардіоміоцитів при зростанні  $Ca^{2+}$  — це генерація мітохондріями АФК та відкриття МППП [20].

Так як  $Ca^{2+}$  прискорює активність ЦТК, це призводить до посиленого витоку електронів і, таким чином, формування АФК на електронтранспортному ланцюзі. Також мітохондріальне  $Ca^{2+}$ -ПНВ інгібує глутатіонредуктазу — антиоксидант матриксу.

### **1.1.3.5. Різниця в чутливості двох фракцій мітохондрій до $Ca^{2+}$ -ПНВ**

Стосовно різниці в чутливості двох фракцій мітохондрій до дії високих концентрацій кальцію, то тут немає повної визначеності. Так, згідно [53, 37], навантаження кальцієм СС мітохондрій призводить до звільнення цитохрому с, в той час як при тих же навантаженнях кальцієм ІФ фракції, вивільнення цитохрому с не спостерігалось, що вказує на більшу чутливість СС фракції до  $Ca^{2+}$ -індукованого відкривання МППП. [38] відмічають у ССМ меншу  $Ca^{2+}$ -акумулюючу здатність та сильніше пригнічення синтезу АТФ при  $Ca^{2+}$ -ПНВ. За

даними деяких авторів [42], ІФМ значно стійкіші до  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого відкривання МППП ніж СС.

На противагу цьому, інші [24] зазначають більшу швидкість падіння показників світлорозсіювання ІФМ у відповідь на  $\text{Ca}^{2+}$  та оксидант.

#### **1.1.4. Мітохондріальна пора перемінної проникності**

Мітохондріальна пора перемінної проникності визначається як раптове зростання проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани до низькомолекулярних розчинених речовин (до 1,5 кДа) у відповідь на численні стимули, включаючи високий рівень  $\text{Ca}^{2+}$  та оксидативний стрес, особливо коли спостерігається висока концентрація фосфору та виснаження запасів аденін нуклеотидів. Такі умови спостерігаються під час ішемії та наступної реперфузії, коли відкривання МППП призводить до необоротних пошкоджень серця [17, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65].

Перші петч клемп реєстрації на ВММ були опубліковані в 1987, зареєстрована провідність була  $\sim 100$  пСм [66, 55].

Відкривання МППП викликає деполяризацію мітохондрій, втрату іонного гомеостазу та блокування активності дихального ланцюга та синтез АТФ [17]. Відкривання МППП найчастіше реєструється в експерименті як  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане набухання ізольованих мітохондрій, яке спричинене надходженням води та розчинених речовин через відкриті пори по осмотичному градієнту завдяки наявності нерозчинних матриксних білків [55].

Так як точний молекулярний склад МППП не встановлений, ця пора має бути визначена функціонально, на основі її фармакологічних та біофізичних властивостей. Це завдання не з легких, так як МППП — багатогранне, мультифакторне явище, яке не має абсолютної залежності від жодного параметру [57]. Але все ж вказується мінімальний набір невід'ємних властивостей, який включає:

- наявність  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі;
- залежність від рН матриксу (закиснення інгібує);

- потенціалзалежність (деполяризація підвищує чутливість до  $\text{Ca}^{2+}$ -ПНВ);
- оксидативний стрес.

Відкриття і закриття пори є зворотнім процесом як в короткому (мс) так і в тривалому (секунди) часовому діапазоні [58].

**1.1.4.1. Молекулярна композиція МППП** точно не встановлена і суперечлива [67]. Вважалось, що до її складу входять АНТ, циклофілін D, потенціалзалежний аніонний канал, гексокіназа та інші. Зараз запропоновано, що структура пори зкомпонована з латерального стержню [68] чи з с кільця АТФ-ази [69, 70]. Точний механізм та спосіб формування пори все ще не ясний [17]. Зазначається, що насправді МППП може бути різною та динамічною, тобто змінюватись зі статусом клітини або при дії фармакологічних препаратів, і залежати від моделі, на якій досліджується [15], розмір пори може варіювати в різних мітохондріях. Це бачення пори як «варіабельної» узгоджується з її «випадковою» природою, зазначають [55], тобто що вона складається з компонентів, чиє головне завдання дещо інше.

**1.1.4.2. Регуляція МППП.** Відкривання пори активується  $\text{Ca}^{2+}$  разом з фосфатом та АФК та інгібується численними чинниками — аденін нуклеотидами,  $\text{Mg}^{2+}$ , інгібіторами циклофіліну D (циклоспорин А, сангліферин). Активація МППП може регулюватись на рівні модуляції кіназами та посттрансляційними модифікаціями циклофіліну D [65].

Ендогенні стимули, що можуть модулювати МППП, включають чи прямі молекулярні ефектори ( $\text{Ca}^{2+}$ , жирні кислоти) чи непрямі патологічні процеси (гіпоксія, старіння). Численні екзогенні молекули індукують чи інгібують пору в різноманітних ситуаціях — це ендогенні білки, ксенобіотики, ліки, токсини, білки вірусного чи бактеріального походження [15].

В умовах нормальної клітинної фізіології, необхідна надійна регуляція для уникнення порочного кола МППП та наступного мітохондріального ушкодження. Тому декілька захисних сигнальних шляхів сходяться для стабілізації низько-провідного стану та закритої конформації пори. Це досягається посттрансляційними модифікаціями (фосфорилування, ацетилювання) [15].

Метаболічні шляхи також регулюють МППП. Активність ЕТЛ, яка посилює мембранну поляризацію, інгібує активність пори, тоді як деполяризація посилює її.

Вірогідно, що  $\text{Ca}^{2+}$  необхідний не тільки для активації пори, але і для підтримання її відкритою. Агенти, які модифікують мембранний мітохондріальний потенціал, можуть діяти непрямо, через зміни цього параметра. Це може бути запропоновано як можливе чи часткове пояснення ефекту ацил КоА, жирних кислот, таких довголанцюгових ацилкатіонів як сфінгозин та аналоги, локальних анестетиків, здатних формувати амфіпатичні катіони [57]. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$ , необхідна для запуску МППП варіює в залежності від походження мітохондрій, умов дослідження, наявності індукуючих агентів [67].

#### **1.1.4.3. Значення МППП.**

$\text{Ca}^{2+}$ -індукована пермебілізація ВММ спостерігається в мітохондріях дріжджів, грибів, рослин, мух, амфібій, риб, і, звісно, ссавців [57]. Хоча характеристики коливаються, загальний консерватизм МППП говорить про фізіологічну роль контрольованої проникності ВММ. Але питання, в чому саме полягає ця роль, залишається відкритим.

Вважається, що пора має фізіологічні функції, такі як швидке вивільнення надлишкового  $\text{Ca}^{2+}$ . Якщо відкривання пори довготривале та поширене, це спричиняє смерть клітини, риси і класифікація якої можуть залежати від обставин [15, 63, 58, 67, 44].

#### **1.1.5. Вплив ізопротеренолу на функціонування мітохондрій серця**

Наявність різноманітних ліпідних сполук, в тому числі омега-3 ПНЖК — необхідна умова нормального функціонування організму в цілому та окремої клітини за звичайних умов. Але при патологічних умовах роль омега-3 ПНЖК стає особливо яскраво вираженою, тому на моделі патології ССЗ зручно досліджувати їх роль в функціонуванні організму на різних рівнях. Кардіоваскулярні хвороби — гетерогенна група патологій серця і кровеносних судин. Інфаркт міокарда — хвороба світового значення, актуальність якої росте, і



зменшення смертності від неї — проблема високого значення. [71, 72]. При ІМ, відбувається значна генерація різноманітних АФК, головне джерело яких — це мітохондрії. Надлишкова продукція АФК призводить до пошкодження клітини, тобто мітохондрії при ІМ — джерело та мішень АФК-опосередкованого кардіального пошкодження. Таким чином, збереження функції мітохондрій серця — один з найбільш перспективних терапевтичних підходів для попередження інфаркту міокарду [73].

Фармакологічна індукція ІМ ізопротеренолом у щурів — зручна модель патології у щурів (через малі розміри коронарних артерій), зазначають [74]. Ізопротереноліндукований ІМ відбувається як результат інтенсивної інотропної та хронотропної дії ізопротеренолу з низькою смертністю тварин.

Ізопротеренол — синтетичний препарат симпатоміметик, який застосовують при бронхоконстрикції. Він відноситься до неселективних бета-2-адреностимуляторів, та однаково впливає як на адренорецептори бронхів, так і міокарду та інших органів. Механізм дії полягає у стимуляції бета-адренорецепторів як першого, так і другого типу, шляхом активації аденілатциклази, яка утворює комплекс із G-протеїном, під впливом якого підвищується утворення цАМФ та стимуляція протеїнкінази А, що призводить до розслаблення гладенької мускулатури.

Ін'єкції ізопротеренолу щурам застосовують для індукції експериментальної моделі інфаркта міокарда. В щурів після ін'єкцій ізопротеренолу спостерігалось значне підвищення рівню загального холестеролу, тригліцеридів та вільних ЖК та значне падіння рівню фосфоліпідів в плазмі, серці та серцевих мітохондріях порівняно з контрольними щурами [75, 76, 77]. Зростає пероксидне окиснення ліпідів мітохондрій, падає кількість мітохондріальних антиоксидантів [78].

Щодо кальцію, то його концентрація значно зростає в мітохондріальній серцевій фракції щурів з ізопротереноліндукованим ІМ порівняно з контролем [74, 79, 80].

Ізопротеренол спричиняє такі морфологічні пошкодження серцевих мітохондрій, як втрата крист, вакуолізація, набухання з нерегулярними розмірами та формою [74, 81, 78, 80]. Також ізопротеренол індукує набухання ізольованих мітохондрій серця в присутності  $\text{Ca}^{2+}$  (20 мкМ) [73].

Ізопротеренол індукує значне падіння активності мітохондріальних ферментів ЦТК (малат-, ізоцитрат-, сукцинат-, альфа-кетоглутаратдегідрогенази) та дихального ланцюга (НАДН-дегідрогенази та цитохром-с-оксидази) [82, 79, 80, 78, 74].

Після ізопротереноліндукованого ІМ у щурів спостерігалось значне падіння активності супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та концентрації відновленого глутатіону в серцевих мітохондріях [74, 79].

Є свідчення, що за умов ізопротереноліндукованого пошкодження знижується швидкість фосфорилування мітохондрій в метаболічному стані 3 за Чансом [82, 83, 72] та дихальний контроль [82, 83, 72]. Але, як показано в роботі [72], зміна показників дихання відмічалась при окисненні сукцинату, тоді як в роботі Wang S.B. та ін. [79] тільки при окисненні глутамату та малату.

### **1.1.6. Іонні канали мітохондрій**

Серед **іонних каналів мітохондрій** можна назвати потенціалзалежний аніонний канал в ЗММ, у ВММ — це КАТФ-канали,  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні калієві канали великої, середньої та малої провідності,  $\text{Kv}1.3$ , рН-чутливі  $\text{K}^+$  канали (TASK-3), МППП, хлорні канали,  $\text{Mg}^{2+}$ -проникні канали Mrs-2, кальцієвий уніпортер та роз'єднуючі білки. Провідність поодиноких каналів варіює від кількох пікосименсів (МКУ) до наносименсів (МППП) [84].

Окрім мітоКАТФ-каналів, які видимо, відрізняються від своїх аналогів у плазмалемі, калієві канали у ВММ мають біофізичні, біохімічні і фармакологічні характеристики, які нагадують відповідні канали плазматичної мембрани, з чого можна зробити припущення, що білкова будова та сама [84].

### 1.1.6.1. Цикл $K^+$ в мітохондріях, наслідки його входу в мітохондрії

Калієвий цикл в мітохондріях складається з шляхів входу та виходу  $K^+$ ,  $H^+$  та аніонів у ВММ між матриксом та міжмембранним простором, причому ЗММ не становить собою перепони для іонів [85]. Викид протонів електронтранспортною системою генерує електричний мембранний потенціал, який запускає вхід  $K^+$  через канали витоку та мітохондріальні калієві канали. Цей обмін  $K^+$  на  $H^+$  залужнює матрикс, що спричинює вхід фосфату через електронейтральний  $P_{no}-H^+$  симпортер. Вхід калію супроводжується входом води по осмотичному градієнту з наступним невеликим набуханням матриксу. Надлишковий  $K^+$  виводиться через  $K^+/H^+$ -антіпортер.

Цільність ВММ та суворий контроль її проникності — необхідна умова функції мітохондрій. Транспорт калію по його каналам видається важливим механізмом контролю цілісності ВММ [86].

Досить тривалий час активація мітохондріальних та сарколемальних АТФ-залежних калієвих каналів вважалась основним кардіопротекторним механізмом і чимало робіт присвячено дослідженню кардіозахисної дії активаторів КАТФ-каналів [5, 6]. Дійсно, активація КАТФ-каналів зменшує пошкодження при ішемії/реперфузії, зменшує частоту виникнення аритмій [87].

Здатність інтегрувати зміни у внутрішньоклітинному кальції з мембранним потенціалом, робить ВКСа-канали важливою системою з негативним зворотнім зв'язком, пов'язуючи зміни у внутрішньоклітинному кальції з гіперполяризуючими калієвими струмами вихідного випрямлення [88].

Наявність та активність ВКСа-каналів встановлена також у внутрішньоклітинних мембранах, включаючи ядерну мембрану, мембрани ЕПР, Гольджі та мітохондрії [89]. Активність мітоВКСа-каналів спостерігалась в експериментах на мітопластах клітин ссавців та в експериментах на планарних ліпідних бішарах. Ці канали ідентифіковані в мітохондріях в клітинних лініях гліоми, в астроцитах та в клітинах шлуночків мозку, скелетних м'язів, мозку, ендотеліальних клітинах, з провідністю від 276 до 307 пСм (симетричний калієвий розчин в 150 мМ). Ці канали активуються кальцієм, диСІ-DНАА,

NS1619, 17-естрадіолом, гіпоксією, блокуються харибдотоксином, іберіотоксином, паксиліном [90].

### **1.1.6.2. Вплив модуляторів ВКСа-каналів на дихання мітохондрій**

Вплив модуляторів ВКСа-каналів на дихання мітохондрій зазвичай досліджується при використанні активатору цих каналів NS1619. За даними літератури, NS1619 (30 мкМ) прискорює дихання мітохондрій в МС-2 та МС-4 з НАДН-пов'язаним субстратом піруватом та з ФАДН<sub>2</sub>-пов'язаним сукцинатом, причому блокатор каналів паксилін відміняв цей ефект [91, 92]. З піруватом як субстрат, NS1619 в концентрації 10, 20 і 30 мкМ не впливав на стан 3 дихання, але 50 мкМ NS1619 значно його зменшував. З сукцинатом, кожна концентрація NS1619 зменшувала швидкість дихання в МС-3. Кожна концентрація NS1619 дещо зменшувала ДК в умовах всіх субстратів, вказуючи на м'яке роз'єднання. З сукцинатом як субстрат, паксилін не блокував дію NS1619 на МС-3. Тобто [91, 93, 94] демонструють, що відкривання ВКСа-каналів прискорює швидкість дихання в МС-2 та МС-4, але не впливає на швидкість при МС-3.

## **1.3. Вплив омега-3 ПНЖК на функціонування серцево-судинної системи (мітохондрії та ендотелій судин)**

### **1.3.1. Структура ПНЖК. Кардіоліпін.**

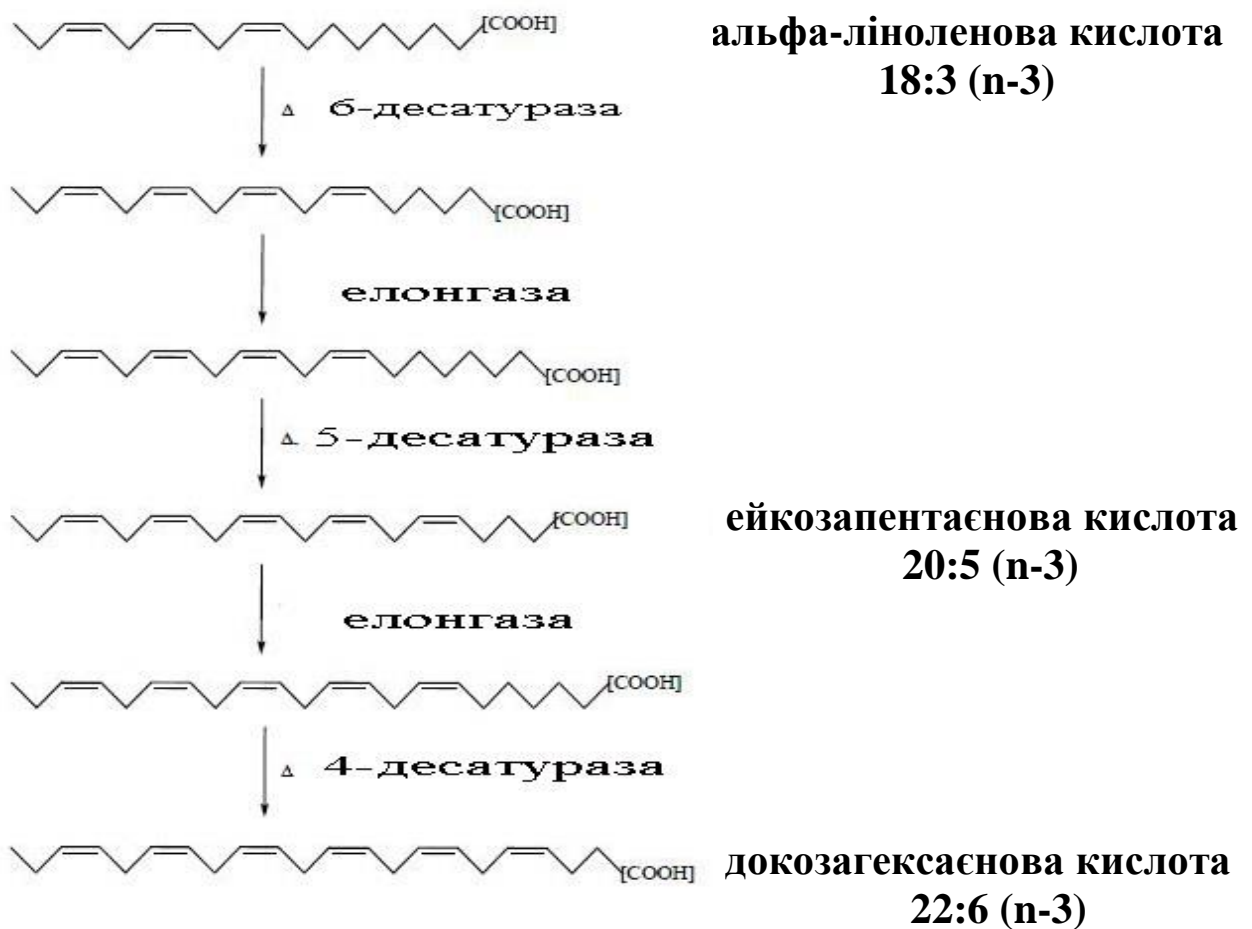
Омега-3 поліненасичені жирні кислоти — клас ненасичених жирних кислот з щонайменше двома ненасиченими (подвійними) вуглець-вуглецевий зв'язками в *cis*- конфігурації в омега-3 положенні.

Лінійний ланцюжок вуглецевих атомів, пов'язаних одинарними та подвійними зв'язками, має з одного боку карбоксильну групу —COOH, з іншого метильну групу —CH<sub>3</sub>. Літерою альфа позначається перший атом ланцюжка від карбоксильної групи, омега (остання літера в грецькому алфавіті) — останній атом від карбоксильної групи, незалежно від довжини ланцюга.

### **Шлях метаболізму $\alpha$ -ЛК, ЕПК та ДГК**

Організм ссавців не здатний синтезувати de novo омега-3 ПНЖК через відсутність ферментів, необхідних для утворення подвійного зв'язку в омега-3 положенні.

Родоначальник омега-3 ПНЖК в організмі ссавців — альфа-ліноленова кислота (АЛК), джерело якої — виключно рослинне. Вона являється важливим компонентом фотосинтетичного апарату водоростей та вищих рослин, де зазвичай і синтезується. В ліпідах тварин, це, зазвичай, мінорний компонент (<1%).



**Ряд перетворень омега-3 ПНЖК — альфа-ліноленова, ейкозапентаєнова, докозагексаєнова**

АЛК може перетворюватись далі шляхом елонгації та десатурації в довго ланцюгові омега-3 ПНЖК — ейкозапентаєнову (ЕПК) (20:5  $\omega$ -3) та далі (при бета-окисненні) в ДГК (22:6  $\omega$ -3) [95, 96]. В організмі людини, перетворення АЛК дуже повільне і незначне — близько 1-5% перетворюється в ЕПК та 0,1% в ДГК у молодих чоловіків та дещо вище в жінок. Ці показники падають до 50% при так званій «Західній дієті», багатій на омега-6 ПНЖК. Тобто основна частина ЕПК та ДГК мають надходити з їжею.

### **Кардіоліпін- фосфоліпід внутрішньої мембрани мітохондрій**

Кардіоліпін (або інакше 1,3-бис-(sn-3'-фосфатидил)-sn-гліцерол) являє собою унікальний аніонний фосфоліпід: два фосфатидилгліцерола об'єднані з гліцеролом, утворюючи димер. Тобто має 4 хвоста ЖК та 2 залишка ортофосфорної кислоти. Чотири алкільні групи КЛ відкривають широкі можливості для різноманіття, але зазвичай серцевий кардіоліпін має 4 ланцюги лінолевої кислоти (18:2). Модифікація ланцюгів відбувається при ряді хвороб та може модифікуватись після споживання різних ЖК [19].

КЛ зазвичай асоційований з мембранами, призначеними до виробництва АТФ, за рахунок електрохімічного градієнта, створеного ЕТЛ. Такими мембранами є бактеріальна плазматична мембрана та ВММ. КЛ забезпечує оптимальну структуру для взаємодії між комплексами ЕТЛ [97].

КЛ необхідний для оптимальної активності комплексів I, III, IV та V. Також, для оптимальної активності мітохондріальних аніонних переносників — таких як АНТ та карнітин – ацилкарнітин, цитрат, фосфат та піруват переносники.

КЛ дуже чутливий до дії АФК через високий вміст ненасичених ЖК. Оксидативне пошкодження КЛ негативно впливає на функцію мітохондріальних мембран через зміну текучості мембран, іонної проникності, структури і функції компонентів ЕТЛ, що призводить до зменшення ефективності окисного фосфорилування та до апоптозу [54].

[98] підкреслюють, що:

- КЛ відіграє як функціональну так і стабілізаційну роль в мультисубодиницях інтегральних мембранних білків;
- КЛ важливий для між- і внутрішньо- білок-білкових взаємодій;
- Подвійний ефект "клею" та "мастила" кардіоліпіну забезпечує стабільність та гнучкість функціонування мембранних білків;
- І полярна, і гідрофобна частини КЛ важливі для взаємодії з білками.

Вплив дієти на рівень кардіоліпіну і, таким чином, на функцію таких білків як АНТ, може також впливати на індукцію МППП [96]. Окиснений КЛ, доданий екзогенно до мітохондрій, підвищує чутливість до  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованої МППП. В той же час, окиснення ендогенного КЛ (терт-бутил гідропероксидом) призводить до відкриття МППП. Тобто  $\text{Ca}^{2+}$  та окиснений КЛ можуть відігравати координуючу роль в відкриванні через взаємодію з компонентами МППП [97].

**1.2.2. Вплив омега-3 ПНЖК на потенціал мітохондрій.** ПНЖК зменшують мембранний потенціал інтактних HL-60 клітин, причому дія омега-3 ПНЖК була сильнішою ніж омега-6 ПНЖК. Додавання ПНЖК стимулювало циклоспорин А-чутливе набухання та мембранну деполаризацію ізольованих мітохондрій [99].

**1.2.3. Зазначають дві точки зору стосовно впливу омега-3 ПНЖК на дихання мітохондрій.** Автори не спостерігали ніякого впливу омега-3 ПНЖК на швидкості дихання мітохондрій в МС-3, МС-4, ДК та АДФ/О [100, 101, 102, 103, 104, 105, 19]. Автори [106, 107] вважають, що омега-3 ПНЖК зменшують швидкість дихання в МС-3, МС-4, та ДК.

**1.2.4. Вплив ПНЖК на МППП.** [99] спостерігали циклоспорин А-чутливе набухання мітохондрій в присутності вільних ЕПК та ДГК в присутності низьких концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$ , причому концентрація ДГК, необхідна для індукції МППП, була нижчою. Годування ДГК, але не ЕПК, значно збільшувало кальцієву ємність мітохондрій — показник відкриття МППП [100].

**1.2.5. Вплив ПНЖК на утворення АФК.** ПНЖК можуть модулювати утворення АФК або роз'єднанням, чи взаємодією з комплексами дихального ланцюга. Ступінь модуляції залежить від режиму електронного транспорту (прямий чи зворотній), а також від концентрації ПНЖК. Терапевтичний підхід, з

використанням малих кількостей ПНЖК був би оснований на концепції, що слабе роз'єднання зменшує продукцію АФК мітохондріями [96, 99, 79, 19, 109].

### **1.2.6. Вплив ПНЖК на іонні канали**

Давно встановлено, що ЖК модулюють активність багатьох видів каналів плазмалеми —  $K^+$ ,  $Na^+$ , та  $Ca^{2+}$  [110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118].

Щодо ВКСа-каналів, [118] в експериментах на ізольованих гладеньком'язевих клітинах артерії кролів було встановлено, що вони активуються такими ПНЖК, як арахідонова (АК) та насичена міристинова. Так як міристинова кислота не метаболується через ліпоксигеназний, циклооксигеназний чи цитР450-оксигеназний шляхи з утворенням біоактивних метаболітів, то авторами зроблено висновок, що активність ВКСа-каналів жирними кислотами модулюється прямо.

Також показано вплив ПНЖК на мітохондріальний транспорт кальцію [119, 107]. ПНЖК, але не мононенасичені ЖК чи ненасичені ЖК, індукують вихід кальцію з мітохондрій [120, 121, 96].

Було встановлено [122], що ПНЖК впливають і на активність мітохондріальних ВКСа-каналів у ВММ в клітинах астроцитомі людини. Причому АК модулювала активність каналів тільки при високих концентраціях кальцію, тоді як ДГК та ЕПК при низьких; окиснені продукти АК не відігравали ролі в активації каналів. Вплив ДГК від 10 до 100 мкМ був концентраційнозалежним, а дія ЕПК спостерігалась тільки в половині випадків.

Один з можливих механізмів дії — це пряма взаємодія ЖК з білком каналу чи білків, асоційованих з цим каналом. Другий варіант: ЖК діють, змінюючи ліпідні властивості мембрани, наприклад, діючи як її детергенти, змінюючи плинність мембрани, впливаючи на взаємодію «білок — ліпід», змінюючи заряд мембрани, через модуляторні білки (як ПКС та протеїн фосфатаза) та непрямо — через біоактивні метаболіти ЖК [117, 122].

### **1.2.7. Вплив ПНЖК на функціонування ендотелію**

Окрім добре зафіксованих кардіопротекторних ефектів, дієтичні омега-3 ПНЖК здатні сприяти ендотелійзалежній релаксації на експериментальних



тваринних моделях [123, 124] за рахунок збільшення вироблення NO клітинами ендотелію [125]. Дієтичні омега-3 ПНЖК покращують функції ендотелію шляхом виправлення дисбалансу між ендотеліюпохідними чинниками [126].

Здатність омега-3 ПНЖК покращувати різні аспекти серцево-судинної функції викликала інтерес до ідентифікації молекулярних механізмів, що лежать в основі цих ефектів. Функція клітин ендотелію значною мірою контролюється електричними реакціями ендотеліальних клітин. Чітка кореляція між ендотеліальною дисфункцією та зміненою сигналізацією ендотеліальних клітин повідомлялася в різних тваринних моделях судинних патологій [127, 128, 129, 130, 131]. Підвищена продукція ендотеліального NO супроводжується зростанням  $Ca^{2+}$  в ендотеліальних клітинах [132] та стійкою гіперполяризацією ендотеліальних клітин за рахунок стимуляції ВКСа-каналів, а також інших механізмів транспортування електрогенних іонів, включаючи  $Na^+/Ca^{2+}$  обмінник та  $Na^+/K^+$  АТФазу [133, 134].

Визначення впливу омега-3 ПНЖК, а також збагаченої на омега-3 ПНЖК дієти на різні механізми транспортування іонів в нормі та при патологіях є важливою метою, вирішення якої є важливим для розуміння механізмів, якими ПНЖК впливає на серцево-судинну функцію.

Нещодавно рецептор, пов'язаний з G-білком 120 (GPR120), був визначений як рецептор омега-3 ПНЖК [136]. Незважаючи на те, що роль GPR120 у функції/сигналізації судин незрозуміла, відомо, що рецептор інгібує ангиогенез [137]. Ще одна мішень для омега-3 ПНЖК — це ВКСа-канали [138, 139], що експресуються в клітинах гладенької мускулатури. Хоча мало виражені у здоровому ендотелію більшості судин, ВКСа-канали широко розповсюджені по судинній стінці і є одним з ключових факторів, що регулюють судинну функцію. У клітинах гладеньких м'язів судин, стимуляція ВКСа-каналів протидіє деполяризації під час розвитку міогенного тонусу, таким чином, обмежуючи потенціалзалежний вхід  $Ca^{2+}$  та протидіючи звуженню судин. В ендотеліальних клітинах, експресія ВКСа-каналів вважається підвищеною при патологічних умовах [140], а, отже, канали представляють собою привабливу мішень для

корекції судинної функції. Хоча попередні дослідження, проведені на клітинах гладенької мускулатури, показали стимулюючу дію омега-3 ПНЖК на ВКСа-канали [138, 139, 141], немає єдиної думки щодо механізмів, що лежать в основі цього ефекту. Запропоновано або пряму взаємодію з білковим комплексом каналу, що складається з пороутворюючих Slo1 та допоміжних  $\beta 1$ -субодиниць [141], або залучення метаболітів цитохрому P450 до стимулюючого впливу омега-3 ПНЖК на ВКСа-канали [138]. Відповідно, у цьому дослідженні, проведеному на ендотеліальній клітинній лінії EA.hy926 було на меті дослідити вплив омега-3 ПНЖК та пов'язаних з ними механізмів на активність ВКСа-каналів.

### **1.2.8. Вплив лізофосфоліпідів на функціонування ендотелію**

Довголанцюгові ЛФЛ визнані потужними сигнальними молекулами, які регулюють різноманітні біологічні процеси. У судинній фізіології серед різних ЛФЛ, значну увагу привернули лізофосфатиділінозитол та лізофосфатиділхолін завдяки вазоактивним властивостям, складній фармакології та патофізіологічній актуальності [142]. Підвищений рівень ЛФХ, основного інгредієнта окиснених ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), тісно пов'язаний з розвитком атеросклерозу [143, 144], раннім проявом якого є ендотеліальна дисфункція [145]. У дослідженнях на тваринах і людині, атеросклеротичний процес часто характеризується порушенням ацетилхолініндукованої ендотелійзалежної вазодилатації та зниженою біодоступністю оксиду азоту, що походить з ендотелію [145, 146, 147]. Показано, що ЛФХ та ЛФІ індукують атерогенну активність, включаючи індукцію молекул адгезії васкулярних клітин (VCAM-1) та внутрішньоклітинних молекул адгезії (ICAM-1) [142, 148, 149]. Крім того, ЛФХ та ЛФІ стимулюють міграцію клітин гладенької мускулатури [149], що є вирішальним процесом у патогенезі атеросклерозу.

Вплив ЛФХ та ЛФІ на функції судин залишаються суперечливими. З одного боку, кілька клінічних досліджень на тваринах показали, що ЛФХ викликає ендотелійзалежну NO-опосередковану релаксацію [150, 151, 152], що супроводжується зростанням внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  в

ендотеліальних клітинах [153, 154, 155, 156]. У моделі ЕК пупкової вени людини (HUVEC) було запропоновано, що стимульований ЛФХ вхід  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до активації ВКСа-каналів, та наступним збільшенням виробництва АФК [157]. З іншого боку, добре зафіксовано, що у багатьох судинних руслах ЛФХ фактично гальмує або повністю відмінює ендотелійзалежну релаксацію, викликану ацетилхоліном та брадикініном [158, 159, 160, 161, 162, 163]. Цей ефект супроводжується сильним пригніченням мобілізації  $\text{Ca}^{2+}$  в ЕК [160] та майже повним пригніченням гіперполяризації клітин гладеньких м'язів на ацетилхолін [164].

Запропоновано різні механізми, що підкріплюють вплив ЛФХ на ендотелійзалежну релаксацію, такі як генерація проконструюючих простаноїдів [165] та супероксидних аніонів [163, 166], зменшення вивільнення ацетилхолін-стимульованого NO, ендотелійпохідного гіперполяризуючого фактора (EDHF), або обидва останні механізми [166, 167, 168, 169]. Однак жодне з досліджень не стосувалося змін, що відбуваються в конкретних системах транспортування іонів в ЕК, викликаних ЛФХ. У сукупності механізми, що лежать в основі як стимулювання, так і пригнічення ендотелійзалежної релаксації у відповідь на ЛФХ, досі не розкриті повністю.

Аналогічні парадоксальні спостереження повідомлялися в дослідженнях, що стосуються впливу ЛФІ [170] на скоротливість судин. У мезентерії щурів, що попередньо контрагували, ЛФІ викликає ендотелійзалежну релаксацію, що супроводжується підвищенням внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  у самих ендотеліальних клітинах [171] та лінії ендотеліальних клітин EA.hy926 [172]. Однак у цьому ж судинному руслі показано, що ЛФІ сильно пригнічує ендотелійзалежну гіперполяризацію на ацетилхолін [164]. Незалежно від природи ендотелійзалежної релаксації (NO або EDHF), здатність ендотеліальних клітин генерувати нормальні гіперполяризуючі реакції є надзвичайно важливою та необхідною умовою належної функції цих клітин [127, 130, 173]. Хоча ранні дослідження вказують на залучення  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника до екструзії  $\text{Ca}^{2+}$  з ендотеліальних клітин [174, 175], більш пізні дані свідчать про те, що  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -

обмінник працює в зворотному режимі, роблячи вклад в гіперполяризацію мембрани під час стимуляції на ацетилхолін [133], та гістамін [176, 177] та контролювання ангиогенезу [177]. Відповідно, у цьому дослідженні ми розглянули вплив дії ЛФХ та ЛФІ на гіперполяризацію ендотелію, спричинену ацетилхоліном та гістаміном та струмами  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Експериментальні тварини

Дослідження було проведено на 58 тваринах (45 щурах та 13 мишах) та на культурі клітин (кардіальні клітини лінії HL-1 та ендотеліальні клітин EA.hy926).

Об'єктами досліджень були мітохондрії серця щурів, культура кардіальних клітин лінії HL-1 та ендотеліальних клітин EA.hy926, препарати аорти мишей.

В експериментах використовували дорослих білих щурів-самців лінії Вістар масою близько 250 г віком 5 міс., яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України із вільним доступом до питної води. Дослідження проведені з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

Дослідження **розділу 3.1.** були проведені на 11 самцях щурів. Тварини були розподілені на 2 групи:

**I** — контрольні щури (n=5);

**II** — щури, які отримували примусово перорально препарат «Епадол» у дозі 0,1 мг/100 г маси тіла протягом 4 тиж (n=6). «Епадол» містить 45% омега-3 ПНЖК тваринного походження (суміш ейкозапентаєнової і докозагексаєнової кислот з риб'ячого жиру);

Дослідження **розділу 3.2.** були проведені на 24 самцях щурів. Тварини були розподілені на 3 групи:

**I** — контрольні щури (n=7);

**II** — щури, яким вводили підшкірно розчин ізопротеренолу («Sigma», США) в дозі 60 мг/кг двічі з інтервалом 24 год (n=7);

**III** — щури, які отримували примусово перорально препарат «Епадол» у дозі 0,1 мг/100 г маси тіла протягом 4 тиж; потім тваринам вводили ізопротеренол так, як це робилося у III групі, (n=10).

Тварин, яким вводили ізопротеренол, декапітували через добу після останньої ін'єкції.

Досліди **розділу 3.3.** проводили на культурі кардіальних клітин лінії HL-1;

Досліди **розділу 3.4.** — на 10 самцях щурів

Досліди **розділу 3.5.** проводили на культурі ендотеліальних клітин EA.hy926;

Експерименти **розділу 3.6.** проводили на 13-ти мишах C57Bl/6 обох статей у віці 12-16 тижнів та на культурі ендотеліальних клітин EA.hy926. Евтаназія мишей відбувалася за допомогою шийної дислокації.

## **2.2 Експериментальні розчини та середовище для культивування клітин**

Під час проведення експериментів, а також у перебігу виділення мітохондрій, приготування препаратів аорти та приготування культур клітин використовували такі розчини та середовище для культивування:

**Середовище для культивування.** Лінію ендотеліальних клітин людської пуповинної вени (EA.hy926) вирощували в середовищі DMEM, що містив 10% фетальної бичачої сироватки, 1% пеніциліну/стрептоміцину і 1% НАТ (5 мМ — гіпоксантин, 20 мкМ — аміноптерин, 0,8 мМ — тимідин) і тримали в інкубаторі при 37°C в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub>. Для експериментів клітини висівали на скляні покривні скельця за 48 год до експериментів.

## **2.3 Препарат аорти**

Грудну аорту вирізали, вміщували у фізіологічний розчин, очищали і розрізали на сегменти (2 — 3 мм) під стереомікроскопом. Один з сегментів розрізали і закріплювали ендотеліальною стороною догори в камері запису. Фармацевтичні агенти застосовували до препарату додаючи їх у зовнішньо-клітинний розчин. Досліди проводили при кімнатній температурі.

## **2.4 Виділення фракцій мітохондрій з міокарда щурів.**

Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування. Диференціальне центрифугування субклітинних структур ґрунтується на відмінності в їх розмірах і щільності та використовується для поділу компонентів

гомогената тканини на ряд фракцій клітини: ядра, мітохондрії, мікросоми і т.д. Кожна з фракцій клітини осідає при певній швидкості центрифугування і часу. Надосадова фракція складається з розчинної фази цитоплазми та зруйнованих органел.

Дві субпопуляції мітохондрій серця виділяли відповідно до методу, описаного Palmer (1977) [26]. Всі розчини мали температуру 2°C. Серця промивались 0,9%-м розчином KCl та подрібнювали в буфері А (містив, у мМ: сахарозу 250; Tris-HCl 20, рН 7,2), який містив 1 мМ ЕГТА, 0,5% БСА. До складу середовища гомогенізації (буфера А) пред'являли особливі вимоги. Для запобігання пошкодження мембран мітохондрій, середовище містило ізоосмотичний розчин сахарози. Сахароза не тільки створює певну тоничність середовища, але і сприяє кращому збереженню мітохондрій, стабілізуючи мітохондріальні мембрани. З метою нейтралізації гомогената, який закислюється кислотами, що звільнюються при руйнуванні клітини і органел, застосовують буферну систему. Використовували, як найбільш часто вживанну, трис-буферну систему (триоксиметиламінометан), що має слаболужну рН. В підборі концентрації буфера і рН середовища важливо встановити, наскільки сильно відбувається зміщення рН при подрібненні дослідної тканини (найбільш сприятливе для мітохондрій середовище близьке до нейтрального). Видалення надлишку двовалентних катіонів, що пригнічують окиснення і фосфорилування, досягається зазвичай за допомогою хелатуючих агентів (комплексоутворювачів) — ЕДТА і ЕГТА. Хелатуючу дію пов'язують з поліаніонними властивостями їх молекул, що містять чотири карбоксильні групи. В даному дослідженні було вибрано ЕГТА, так як в результаті високої спорідненості ЕДТА до іонів магнію, останній видаляється з місць зв'язування на мембрані і білках мітохондрій. Це призводить до виникнення конформаційних змін, в результаті чого протонна провідність внутрішньої мембрани збільшується і мембранний потенціал падає. Також ЕДТА змінює кінетику взаємодії мітохондріальних ферментів з АТФ і АДФ. Роз'єднуючу дію на мембрани мітохондрій вільних жирних кислот усували

за допомогою бичачого сироваткового альбуміну (БСА), що володіє адсорбуючими властивостями, використовувалась концентрація 0,5%.

Подрібнену тканину гомогенізували тefлоновим гомогенізатором. Процес гомогенізації був якомога коротшим. Гомогенат центрифугували при 700g та 2°C, з супернатанту виділяли субсарколемальні мітохондрії, використовуючи диференційне центрифугування (7000g, 2°C). Осад, що залишився, ресуспендували в буфері А, обробляли Nagarse в концентрації 2,5 мг/г тканини і гомогенізували. Гомогенат розводили в 2 рази буфером А, і з суспензії виділяли інтерфібрилярні мітохондрії диференційним центрифугуванням.

Визначення ступеню спряження ОКФОС отриманого препарату мітохондрій проводилось за величинами дихального контролю і відношення АДФ/О. Параметр АДФ/О, розраховувався як відношення молярних кількостей доданого АДФ і кисню, поглиненого суспензією мітохондрій в процесі фосфорилювання цієї доданої кількості АДФ.

## **2.5 Реєстрація поглинання кисню ізольованими мітохондріями.**

Поглинання кисню мітохондріями вивчали з використанням закритого електрода Кларка та прилада «Оксиграф» («Hansatech», Велика Британія). Середовище інкубації містило (мМ): КСl — 120, тріс-НСl — 10, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> — 10; рН 7,2. В якості субстрату окиснення використовували 10 мМ розчин сукцинату натрію. Активне дихання ізольованих мітохондрій ініціювали додаванням 400 мкМ АДФ.

Після додавання мітохондрій в інкубаційну камеру, мітохондріальне дихання знаходиться в метаболічному стані 2 (МС-2) або в стані спокою [181, 182]. Вважається, що в цьому метаболічному стані мітохондрії не є значно функціонально навантажені (хоча деякі дослідники [179] підкреслюють, що мітохондрії транспортують субстрати і [за наявності зворотнього переносу електронів, як правило, сполученого з генерацією АФК] потребують значних затрат енергії). У МС-2 дихання повинно бути мінімальним. У МС-2 зовні мітохондрій немає аденіннуклеотидів (АДФ і АТФ), і значення мембранного потенціалу максимальне. Швидкість споживання кисню в МС-2 визначається



вихідною, тобто властивою при даних умовах, провідністю внутрішньої мембрани для протонів, яка розсіює мембранний потенціал [180].

Стимуляція окисного фосфорилування. Приблизно через хвилину інкубації мітохондрій в МС-2 в камеру додавали АДФ. Мітохондрії починають фосфорилувати АДФ до АТФ. Це і є окиснювальне фосфорилування, або метаболічний стан 3 (МС-3). Фосфорилування АДФ споживає енергію, тому мембранний потенціал тимчасово знижується до певного рівня. Зазвичай, зниження мембранного потенціалу в МС-3 становить 30-40 мВ. Величина зниження потенціалу мембрани в МС-3 залежить від ефективності дихання мітохондрій, тобто співвідношення швидкостей дихання і дисипації енергії. Синтез АТФ призводить до зменшення мембранного потенціалу на 20 — 40 мВ і швидкість споживання кисню збільшується в кілька разів. Ступінь зниження мембранного потенціалу залежить від здатності мітохондрій стимулювати дихання.

Метаболічний стан 4, або «МС-4», є по суті диханням мітохондрій в стані «спокою», тобто, коли мітохондрії окиснюють субстрати дихання, повністю енергізовані і начебто не роблять «корисної роботи». Низька швидкість дихання непошкоджених мітохондрій в стані 4 пов'язана з тим, що високий мембранний потенціал (який створюється за відсутності АДФ і при наявності кисню і субстратів) перешкоджає переносу протонів через внутрішню мембрану, пов'язаного з роботою дихального ланцюга, і тим самим зупиняє потік електронів по цьому ланцюгу. Витік іонів через мембрану знімає мембранний потенціал і призводить до збільшення швидкості дихання (МС-4). Тому зростання МС-4 — свідомство збільшення проникності внутрішніх мембран мітохондрій, зростає при пошкодженні органел.

Відношення швидкостей споживання кисню в МС-3 і МС-4 (МС-3 / МС-4) називається «Дихальний Контроль» (ДК). Традиційно вважається, що високий ДК свідчить про високий ступінь спряження окисного фосфорилування мітохондрій, а зменшення ДК вказує його роз'єднання. Вважається [179], що з деякими субстратами і, особливо, сумішами субстратів, зниження ДК не означає

погіршення якості мітохондрій, але відображає збільшення швидкості споживання кисню в МС-4 через зростання швидкості зворотного перенесення електронів. Зменшення ДК може бути пов'язано з гальмуванням швидкості фосфорилування АДФ, наприклад, через пригнічення аденіннуклеотид транслокази (АНТ). Після того, як мітохондрії закінчили фосфорилування доданої в інкубаційну камеру АДФ, мембранний потенціал і швидкість дихання в МС-4 повинні повернутися до початкового стану до додавання АДФ. У МС-4, на відміну від МС-2, зовні мітохондрій тепер знаходяться АТФ і АДФ, які взаємодіють з мітохондріями через АНТ. Теоретично, МС-2 і МС-4 повинні бути однакові, проте в реальних експериментах це спостерігається не завжди.

Зниження ДК до одиниці супроводжується зниженням коефіцієнта АДФ/О до нуля і є свідченням роз'єднання процесів окиснення і фосфорилування в мітохондріях при їх пошкодженні.

### **Електрод Кларка.**

У мітохондріології найпоширеніший метод вивчення змін концентрації кисню в розчині заснований на використанні електрода Кларка, який був винайдений Leland C. Clark. Електрод Кларка зробив вимірювання вмісту кисню в рідинах набагато простішим, ніж полярографічний метод, який застосовувався до цього. Полярографія, як електроаналітичний метод, була винайдена в 1922 році чеським хіміком Jaroslav Neujovsky. Прилад для полярографії використовував ртуть в якості робочого електроду, і серед інших застосувань використовувався також і для визначення кисню. Тому за «звичкою», метод вимірювання дихальної активності мітохондрій, незважаючи на застосування електрода Кларка, продовжують називати «полярографіческий метод».

Дихання мітохондрій вивчали з використанням закритого електрода Кларка та прилада «Оксиграф» («Hansatech», Велика Британія). Кисневий електродний диск Hansatech Instruments — це спеціалізована форма електрохімічної комірки, відомої як датчик типу Кларка. Він містить центральний платиновий катод та концентричний срібний анод, пов'язані електролітичним

містком і постійно поляризується блоком управління кисневого електроду. Електроди встановлені в диск з епоксидної смоли з платиновим катодом в центрі купола, оточеного рівчаком, що містить срібний анод. Дно камери має також гумові кільця для кріплення мембрани і герметизації циліндра камери. Поверхня платини повинна бути добре відполірована. Щоб вберегти поверхню платини від реагування з білками і хімічними сполуками в середовищі, платиновий катод і електрод порівняння відокремлені від середовища інкубації тонкою плівкою політетрафторетилену.

Обсяг камери до 1 мл. Камера для інкубації оточена термостатуючою камерою для циркуляції води. В ході експерименту інкубаційна камера повинна бути щільно закрита кришкою, щоб запобігти контакту інкубаційного середовища з повітрям. Вузкий отвір в кришці дозволяє додавати реактиви в камеру.

Як розчин електроліту використовували 50% насичений розчин КСІ. Готували шляхом розчинення 17,5 г безводної солі в 100 мл деіонізованої води при температурі 25°C. Застосування поляризуючої напруги в 700 мВ іонізує електроліт і ініціює потік струму за допомогою ряду електрохімічних реакцій. Робота електрода Кларка заснована на реакції відновлення кисню на поверхні полірованого платинового електрода:  $O_2 + 4e^- + 2H_2O \rightarrow 4OH^-$ . Кисень споживається під час електрохімічних реакцій, тому величина струму пов'язана з концентрацією кисню в навколишніх середовищах.

Швидкість споживання кисню наведена нижче в нмоль  $O_2 \cdot xh^{-1} \cdot mg^{-1}$  білку. Концентрація білка становила 1,0 мг/мл, яку визначали за методом Бредфорд.

## **2.6 Спектрофотометрична реєстрація набухання мітохондрій.**

Пошкодження мітохондрій реєстрували як циклоспорин А-чутливе набухання при дії високих (кінцева концентрація  $10^{-4}$  М  $CaCl_2$ ) концентрацій розчину  $CaCl_2$ . Мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (**буфер Б**) і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при  $\lambda=520$  нм протягом 10 хв. Розчин  $CaCl_2$  додавали на 5-тій хвилині інкубації. Концентрація білка становила 0,1 мг/мл. Зміни оптичної густини мітохондрій на

останній хвилині набухання після дії на них індуктору МППІ виражали у відношенні до величини оптичної густини на 1-ій хвилині набухання.

## **2.7 Електрофізіологічні вимірювання**

Петч-кламп — метод в електрофізіології, який дозволяє дослідити електричну збудливість збудливих клітин та функціональні властивості та щільність іонних каналів. Він включає фіксацію струму і фіксацію напруги, а також декілька конфігурацій петчів («ціла клітина», «внутрішня сторона назовні», перфорований петч тощо), які відрізняються стосовно цілісності мембрани, орієнтації мембрани та зв'язку між внутрішньоклітинним об'ємом та внутрішньопіпеточними розчинами.

Метод був запропонований у 1976 році Neher та Sakmann і полягає у реєстрації струмів, котрі протікають крізь ділянку мембрани, електрично ізольовану від зовнішнього розчину скляною мікропіпеткою. Технічна можливість такої ізоляції виникає з спроможності скла утворювати контакт з високим опором (1 — 100 ГОм) з мембранами клітин — так званий «гігаомний контакт». За наявності гігаомного контакту між піпеткою та мембраною використання підсилювача з низьким рівнем власного шуму дозволяє здійснювати реєстрацію струмів пікоамперного діапазону, що відповідає величинам струмів, що протікають через поодинокі канали. Для вимірювання струмів, що течуть крізь усю мембрану пізніше була розроблена модифікація вищезазначеного методу, яка отримала назву «whole cell». Електрофізіологічні реєстрації у конфігурації «whole cell» передбачають, що після утворення гігаомного контакту, ділянку мембрани під мікропіпеткою проривають від'ємним тиском, після чого з внутрішньоклітинним середовищем встановлюється контакт із низьким опором, що дозволяє реєструвати різницю потенціалів між зовнішньою та внутрішньою частинами клітинної мембрани, тобто трансмембранний потенціал.

Скляні мікроелектроди виготовлювали з боросилікатного скла (зовнішній діаметр трубочок 1,5 мм). Після виготовлення мікроелектроди оплавляли за допомогою розжареного вольфрамового дрота під мікроскопічним контролем.

Заповнення піпетки внутрішньоклітинним розчином проводили за допомогою спеціального філаменту. Після цього піпетку опускали у зовнішньоклітинний розчин, та здійснювали компенсацію різниці потенціалів на границі розподілу розчинів.

Гігаомні контакти між клітинною мембраною і електродом утворювали, притискаючи піпетку з прикладеним до неї невеликим позитивним тиском до поверхні клітини та потім скидаючи цей тиск до атмосферного. Утворення гігаомного контакту контролювали в режимі фіксації потенціалу, подаючи на мембрану прямокутні гіперполяризуючі імпульси амплітудою 5 мВ. Після утворення щільного контакту піпетки з поверхнею мембрани проводили компенсацію ємності піпетки відносно зовнішнього розчину. Конфігурацію «whole cell» отримували при прориві мембрани під піпеткою імпульсами від'ємного тиску.

При проведенні дослідів **розділу 3** опір піпеток становив 7 — 10 МОм. Піпеточний розчин містив (мм): KCl 140, HEPES 10, EGTA 5. Концентрацію вільного Ca<sup>2+</sup> доводили до 10 мкМ додаванням 4,93 мМ CaCl<sub>2</sub>. Склад зовнішнього розчину був аналогічним піпеточному.

При проведенні дослідів **розділу 5** клітини EA.hy926 суперфузували зовнішньоклітинним розчином, що вміщував (у мм): NaCl 140; KCl 5; MgCl<sub>2</sub> 1,2; HEPES 10; глюкози 10; CaCl<sub>2</sub> 2,4. Для реєстрації струмів в конфігурації «whole-cell», розчин піпетки вміщував (у мм): К-аспартату 100; KCl 40; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES 10; EGTA 5; концентрацію вільного Ca<sup>2+</sup> доводили до 100 нМ додаванням 1,924 мМ CaCl<sub>2</sub> (розрахунок за програмою CaBuf). Опір піпеток становив 3 — 5 МОм.

Активність поодиноких каналів реєстрували в конфігурації «inside-out» в симетричних за калієм розчинах. Піпетки заповнювали розчином наступного складу (мм): KCl 140; HEPES 10; MgCl<sub>2</sub> 1; EGTA 5. Концентрацію вільного Ca<sup>2+</sup> доводили до 10 мкМ шляхом додавання 4,931 мМ CaCl<sub>2</sub>; рН доводили до 7,2 додаванням КОН. Опір піпеток складав 5 — 7 МОм. Після утворення гігаомного контакту зовнішньоклітинний розчин перемикали на розчин наступного складу (мм): KCl 140; HEPES 10; MgCl<sub>2</sub> 1; EGTA 5 і 0,3 мкМ (та інші бажані

концентрації) вільного  $\text{Ca}^{2+}$ , які доводили шляхом додавання різних кількостей  $\text{CaCl}_2$ ; рН доводили до 7,2 додаванням КОН. Холестерин видаляли з мембран шляхом попередньої інкубації клітин з 0,5% метил- $\beta$ -циклодекстрином (МЦД) при  $37^\circ\text{C}$  протягом 1 год.

В розділі 6 мембранний потенціал ендотеліальних клітин ізольованої аорти миші вимірювали, використовуючи метод «perforated patch-clamp» в режимі фіксації струму [Bondarenko, 2004]. В якості перфоруючого агенту застосовували ністатин. Піпетки заповнювали розчином, який вміщував (мМ):  $\text{KCl}$  — 145; ЕГТА — 0,3; НЕРЕС — 10; рН доводили до 7,2 за допомогою КОН. Струми  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника реєстрували, використовуючи конфігурацію «whole cell». Зовнішньоклітинний розчин містив (у мМ): 140  $\text{NaCl}$ , 5  $\text{TEACl}$ , 2,4  $\text{CaCl}_2$ , 1,2  $\text{MgCl}_2$ , 10 НЕРЕС, 10 глюкози. Піпеточний розчин містив (у мМ): 110  $\text{Cs}$ -метансульфонат, 10  $\text{NaCl}$ , 20  $\text{TEACl}$ , 2  $\text{MgATP}$ , 10 НЕРЕС, 5 ЕГТА. Концентрацію вільного  $\text{Ca}^{2+}$  доводили до 100 нМ шляхом додавання 1,93 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Рампові зміни напруги (тривалістю 1 с) від -100 мВ до +90 мВ подавались кожні 5 с від підтримуваного потенціалу -40 мВ.

Струми реєстрували з використанням підсилювача EPC7 (List Electronics, Німеччина) при частоті оцифровування  $3 \cdot 10^3 \text{ c}^{-1}$ . Отримані сигнали фільтрували (частота зрізу 1,0 кГц) і оцифровували з частотою дискретизації  $10^4 \text{ c}^{-1}$  з використанням А/D конвертора Digidata 1322A (Axon Instruments, США). Збір даних і аналіз проводили з використанням програмного забезпечення Clampex і Clampfit pClamp (V9.2, Axon Instruments, США).

## 2.8 Матеріали

**ЛФХ16:0** (1-пальмітоїл-2-гідрокси-sn-глицеро-3-фосфохолін) був придбаний в Avanti Polar Lipids; **паксилін** і **СКА-31** були придбані у Alomone Labs; **Nagarse**, **циклоспорин А**, **ізопротеренол**, **ЛФІ**, **ДГК** — Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, США; «Епадол» (Київський вітамінний завод, Київ, Україна) містить 45% омега-3 ПНЖК тваринного походження (суміш ейкозапентаєнової і докозагексаєнової кислот з риб'ячого жиру)

**2.9 Статистичний аналіз числових даних.** Експериментальні данні представлені нижче як середні значення  $\pm$  похибка середнього (s.e.m). Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням t-критерію Стюдента (парного або непарного у відповідних випадках); при між групових порівняннях значення  $p < 0,05$  розглядали як показник достовірності різниць.

В експериментах з клітинами EA.hy926, n вказує кількість досліджених клітин. В досліді на інтактних ендотеліальних клітинах з ізольованих мишачих аорт, n вказує кількість тварин.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### **3.1. ВПЛИВ ДІЄТИ, ЗБАГАЧЕНОЇ ОМЕГА-3 ПНЖК НА ВЛАСТИВОСТІ МІТОХОНДРІЙ МІОКАРДА**

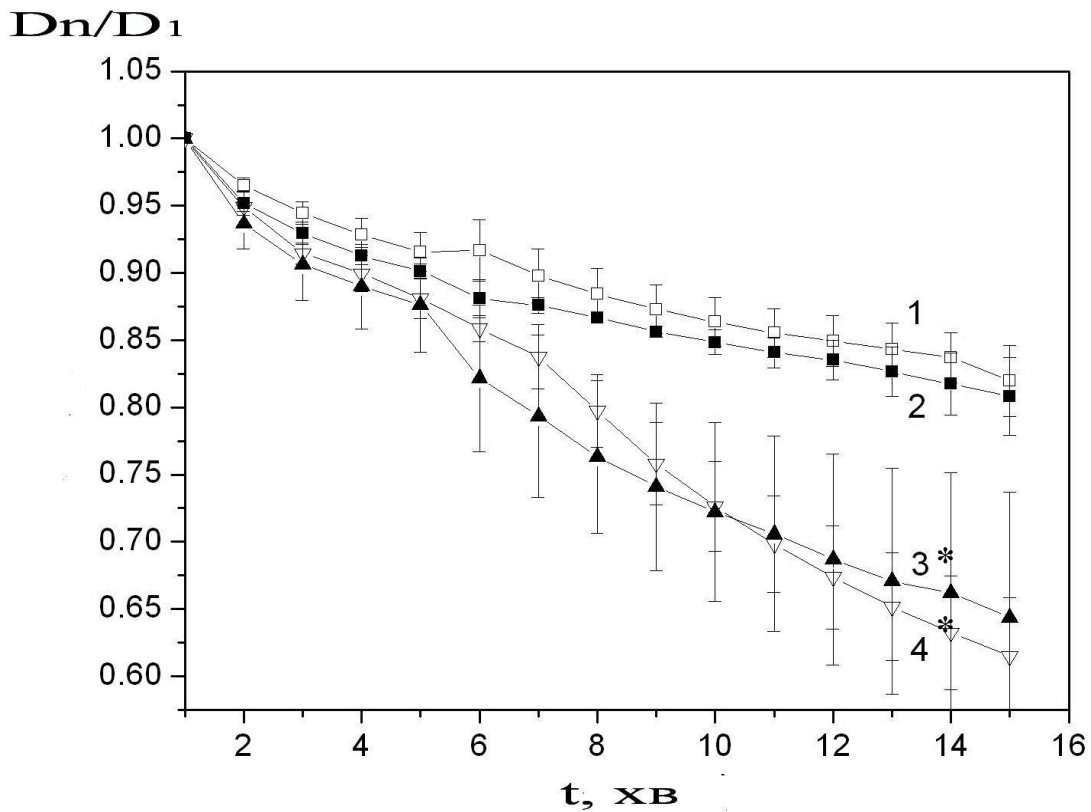
##### **3.1.1. Контрольна група: ІФ та СС мітохондрії мають подібну чутливість до $\text{Ca}^{2+}$**

Зпершу була досліджена чутливість мітохондріальної пори СС та ІФ фракцій мітохондрії до її фізіологічного індуктора — кальцію — в серці щурів (рис.3.1.1). За відсутності зовнішнього  $\text{Ca}^{2+}$ , часовий хід зменшення оптичної щільності, який відповідає набухання мітохондрій, істотно не відрізнявся між СС та ІФ фракціями мітохондрій (до  $0,81 \pm 0,01$  і  $0,80 \pm 0,02$  відповідно), оцінені на 15-й хвилині вимірювання. Додавання у зовнішній розчин  $10^{-4}$  М  $\text{Ca}^{2+}$  з метою індукції відкриття МППП, викликало збільшення набухання в обох фракціях мітохондрій. В експериментах на СС фракції, падіння оптичної щільності спостерігалось до  $0,63 \pm 0,05$  від базового рівня, рівного одиниці. В експериментах на ІФ фракції мітохондрій, зменшення оптичної щільності суспензії у відповідь на додавання  $10^{-4}$  М  $\text{Ca}^{2+}$  суттєво не відрізнялось від значень, отриманих на СС фракції, відповідні значення зменшувались від базового рівня 1,00 до значень  $0,65 \pm 0,06$ . Необхідно відмітити, що кальційіндуковане набухання мітохондрій в обох фракціях повністю попереджалось додаванням класичного інгібітора мітохондріальної пори циклоспорина А (ЦсА), що свідчить про те, що  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане набухання мітохондрій відображає відкриття МППП.

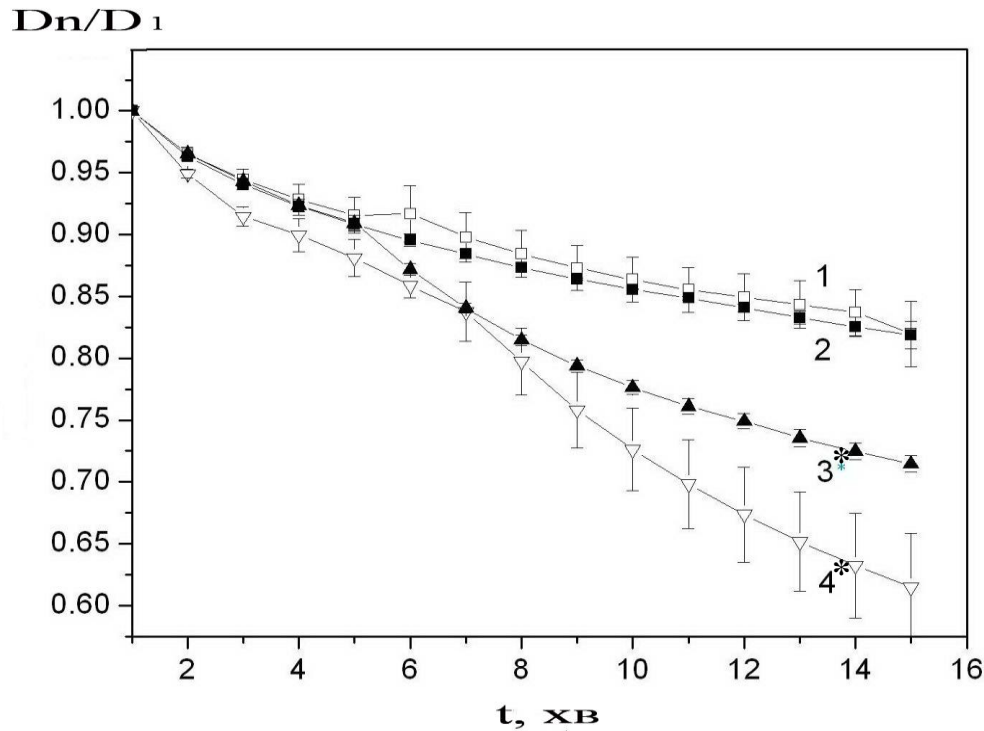
##### **3.1.2. Годування омега-3 ПНЖК знижує чутливість МППП до $\text{Ca}^{2+}$ СС і ІФ фракцій мітохондрій міокарда щурів**

Надалі досліджувався вплив споживання щурами омега-3 ПНЖК на набухання мітохондрій міокарда за відсутності та наявності  $\text{Ca}^{2+}$  в розчині.

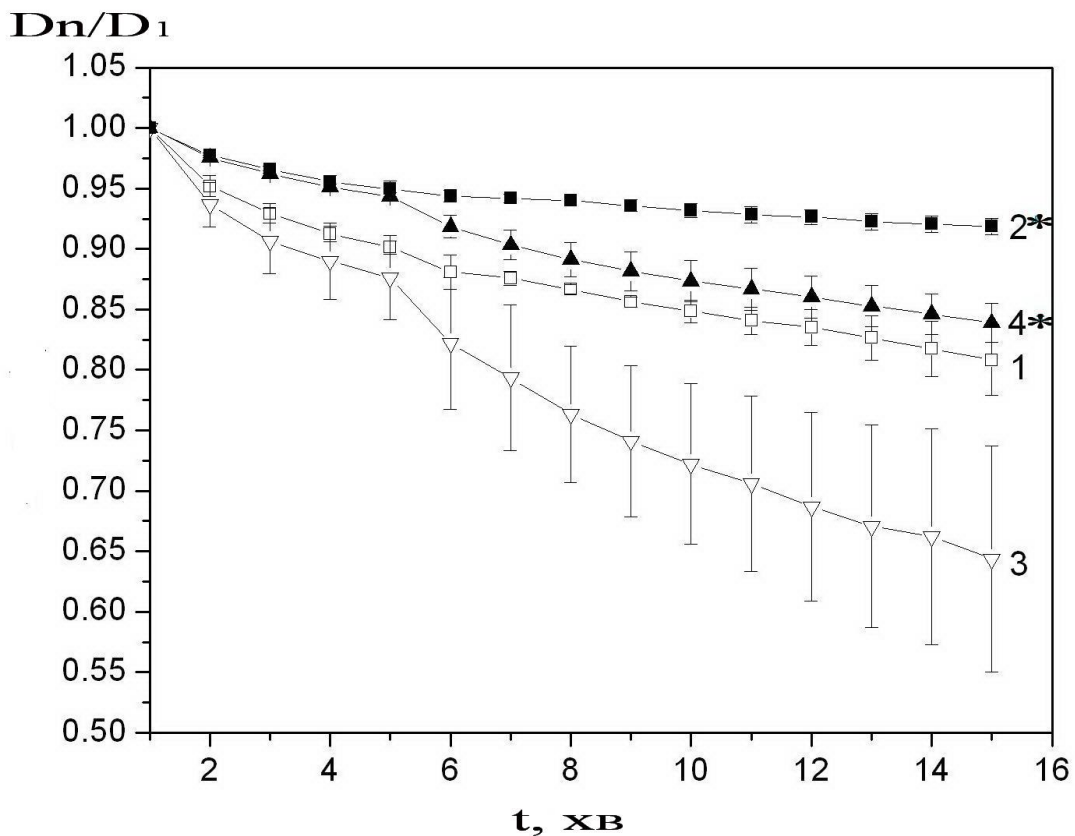




**Рис.3.1.1.** Часовий перебіг зміни оптичної щільності субсарколемальних (СС) та інтерфібрилярних (ІФ) мітохондрій серця щурів контрольної групи в безкальцієвому (відповідно 1, 2) і кальційвмісному середовищах (відповідно 3, 4). Вісь ординат — відношення показника оптичної щільності на  $n$ -ній хв. до показника на 1-й хв, вісь абсцис — час, хв.  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-4}$  M) додавали на 5-й хвилині (3 і 4 записи) для індукування відкриття МППП. Порівнювались ІФ і СС мітохондрій контрольної групи. Кожна точка даних представляє середнє значення для 3 — 5 індивідуальних експериментів. \*  $p < 0,05$  проти відповідних контрольних значень. **1** — часовий хід набухання ІФ мітохондрій з контрольної групи в безкальцієвому середовищі; **2** — часовий хід набухання СС мітохондрії з контрольної групи в безкальцієвому середовищі; **3** — часовий хід набухання ІФ мітохондрій з контрольної групи після додавання  $\text{Ca}^{2+}$  на 5-й хв; **4** — часовий хід набухання СС мітохондрій з контрольної групи після додавання  $\text{Ca}^{2+}$  на 5-й хв.



**Рис.3.1.2.** Часовий перебіг зміни оптичної щільності СС мітохондрій міокарда щурів контрольної та експериментальної груп. в безкальцієвому (відповідно 1, 2) і кальційвмісному середовищах (відповідно 3, 4). Вісь ординат — відношення показника оптичної щільності на  $n$ -ній хв. до показника на 1-й хв, вісь абсцис — час, хв.  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  М) додавали на 5-й хвилині (3 і 4 записи) для індукування відкриття МППП. Порівнювали контрольні та експериментальні групи. Кожна точка являє собою середнє значення 3 — 5 окремих експериментів. \*  $p < 0,05$  проти відповідних контрольних значень. **1** — часовий хід набухання СС мітохондрій з контрольної групи в безкальцієвому розчині; **2** — часовий хід набухання СС мітохондрій з експериментальної групи в безкальцієвому розчині; **3** — часовий хід набухання СС з експериментальної групи після додавання  $10^{-4}$  М  $Ca^{2+}$  на 5-й хв; **4** — часовий хід набухання СС мітохондрій з контрольної групи після додавання  $10^{-4}$  М  $Ca^{2+}$  на 5-й хв.



**Рис.3.1.3.** Часовий перебіг зміни оптичної щільності ІФ мітохондрій ізольованих з міокарда щурів контрольної і експериментальної груп в безкальцієвому (відповідно 1, 2) і кальційвмісному середовищах (відповідно 3, 4). Вісь ординат — відношення показника оптичної щільності на n-ній хв. до показника на 1-й хв, вісь абсцис — час, хв.  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-4}$  M) додавали на 5-й хвилині (3 і 4 записи) для індукування відкриття МППП. Порівнювали контрольні та експериментальні групи. Кожна точка даних представляє середнє значення для 3-5 індивідуальних експериментів. \*  $p < 0,05$  проти відповідних контрольних значень. 1 — ІФ мітохондрії з контрольної групи в безкальцієвому середовищі; 2 — ІФ мітохондрії з експериментальної групи в безкальцієвому середовищі; 3 — ІФ мітохондрії з контрольної групи при додаванні  $10^{-4}$  M  $\text{Ca}^{2+}$  на 5-й хв.; 4 — ІФ мітохондрії з експериментальної групи при додаванні  $10^{-4}$  M  $\text{Ca}^{2+}$  на 5-й хв

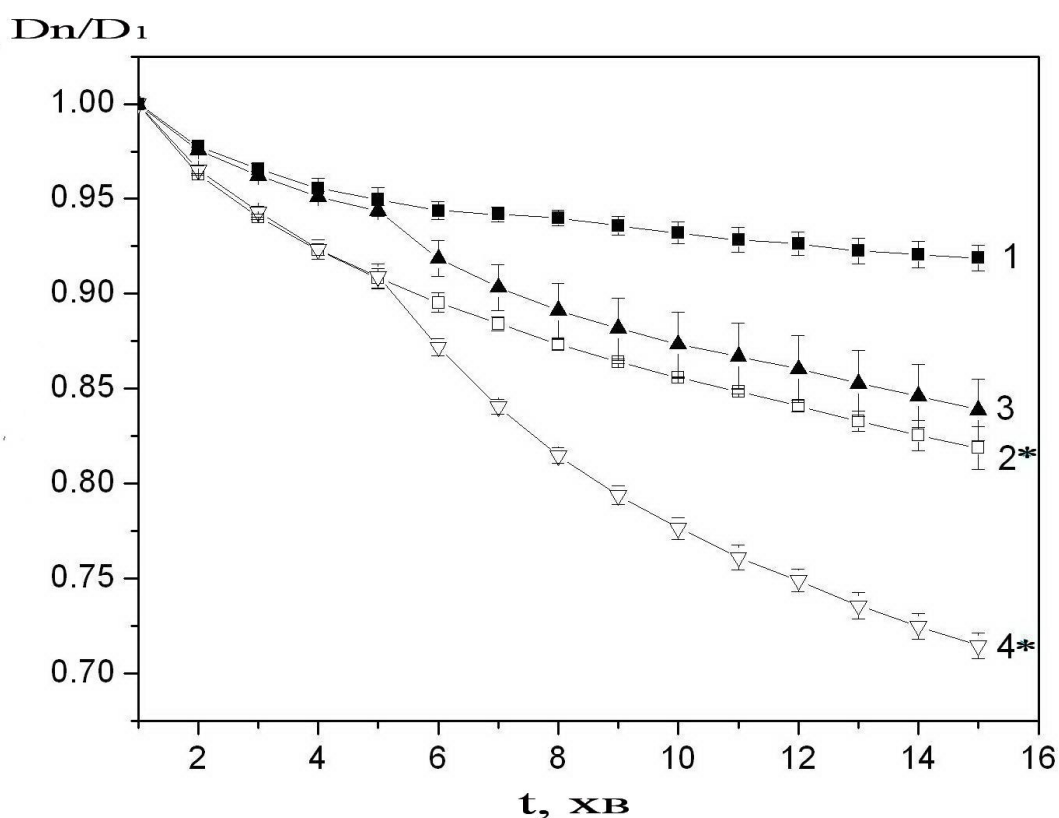
На **рис.3.1.2** представлено вплив омега-3 ПНЖК на часовий перебіг набухання СС мітохондрій в безкальцієвому розчині та в розчині, що містив кальцій. В безкальцієвому середовищі, СС мітохондрії, отримані з контрольної

(рис. 3.1.2. запис 1) та експериментальної (рис. 3.1.2 запис 2) груп, не виявили ніякої різниці протягом часу набухання (падіння оптичної щільності до  $0,81 \pm 0,01$  і  $0,81 \pm 0,01$ , відповідно). Проте, СС мітохондрії виділені з міокарда щурів, які споживали омега-3 ПНЖК (рис. 3.1.2. запис 3), продемонстрували значне ( $p < 0,05$ ) набухання після додавання  $\text{Ca}^{2+}$  (зменшення оптичної щільності до  $0,71 \pm 0,06$ ) в порівнянні з відповідним  $\text{Ca}^{2+}$  -індукованим набуханням СС мітохондрій з контрольної групи ( $0,63 \pm 0,05$ , рис. 3.1.2. запис 4), що свідчить про зменшення чутливості мітохондріальної пори до переходу в стан високої провідності у відповідь на додавання  $\text{Ca}^{2+}$ . Слід зазначити, що на відміну від СС фракції, годування омега-3 ПНЖК призвело до значного зменшення набухання ІФ фракції в безкальцієвому розчині (рис.3.1.3 записи 1 та 2). Крім того, у ІФ фракції, виділеної з експериментальної групи, набухання у відповідь на додавання  $\text{Ca}^{2+}$  значно пригнічувалося порівняно з тією ж фракцією, яка була виділена з контрольної групи (рис.3.1.3 записи 3 і 4). Годування омега-3 ПНЖК пригнічувало падіння оптичної щільності суспензії ІФ мітохондрій з  $0,65 \pm 0,06$  до  $0,83 \pm 1,60$  ( $p < 0,05$ ) на 15-ій хв при додаванні  $\text{Ca}^{2+}$ . В обох мітохондріальних фракціях, виділених з експериментальної групи, циклоспорин А пригнічував набухання мітохондрій у відповідь на додавання в розчин іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , що свідчить проте, що набухання є наслідком відкриття мітохондріальної пори.

### 3.1.3. Захисна дія омега-3 ПНЖК більш виражена в ІФ фракції мітохондрій

В експериментах, проведених на мітохондріях ізольованих з міокарда контрольної групи щурів, набухання мітохондрій в безкальцієвому розчині не відрізнялося між двома фракціями. Але, в ІФ фракції, виділеної з експериментальної групи щурів, яким призначались омега-3 ПНЖК, градуальне падіння оптичної щільності, що спостерігалось в безкальцієвому розчині ( $0,81 \pm 0,01$ ) (Рис.3.1.4. запис 1), було значно менш виражено, ніж в СС фракції ( $0,91 \pm 0,02$ ) (рис.3.1.4. запис 2) ( $p < 0,05$ ). Крім того, у той час як вживання омега-3 ПНЖК призводило до захисту від  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого набухання мітохондрій, як у СС, так і у ІФ фракціях, ступінь захисту виявився різним між двома фракціями. У

ІФ фракції, виділеної з експериментальних щурів, набування мітохондрій у відповідь на додавання  $\text{Ca}^{2+}$  було значно ( $p < 0,05$ ) меншим (падіння розсіювання світла до  $0,83 \pm 0,01$ ), ніж для СС фракції ( $0,71 \pm 0,06$ ). В цілому, отримані дані свідчать про те, що годування омега-3 ПНЖК значно зменшує чутливість МППП



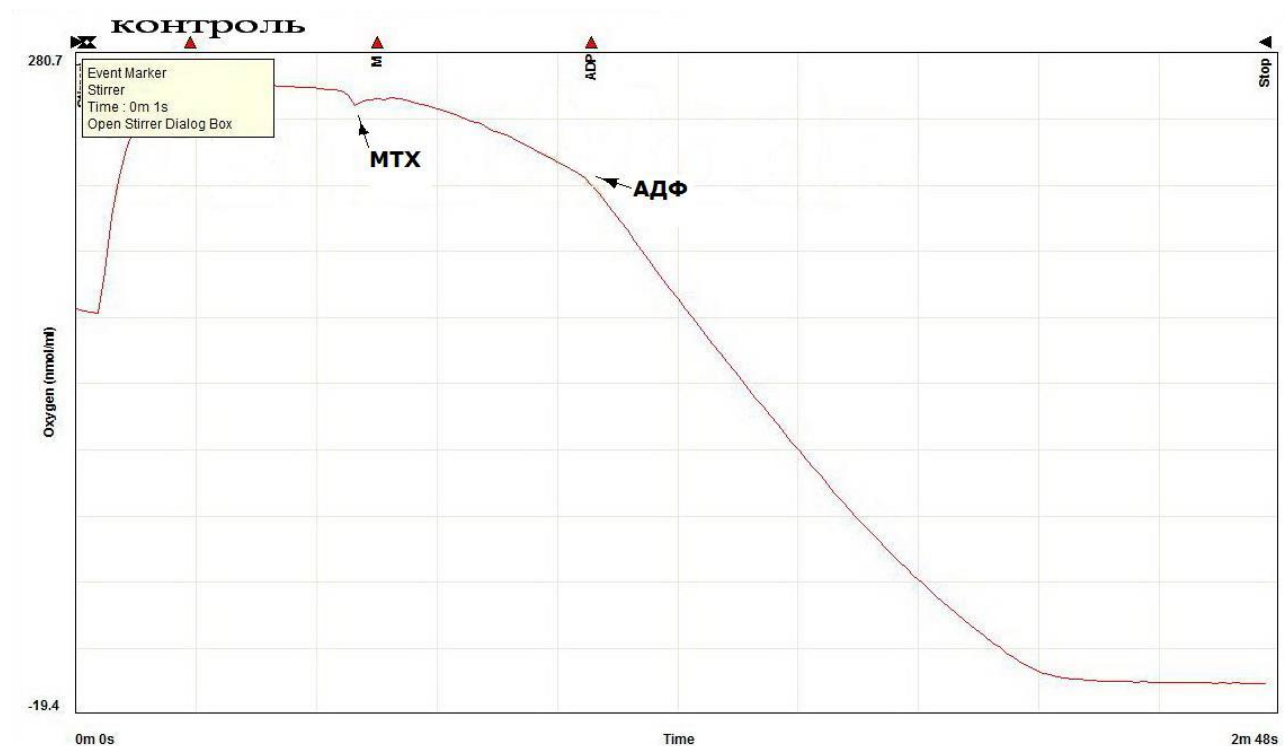
до кальцію у ІФ фракції як в кальційвмісному так і в безкальцієвому розчинах.

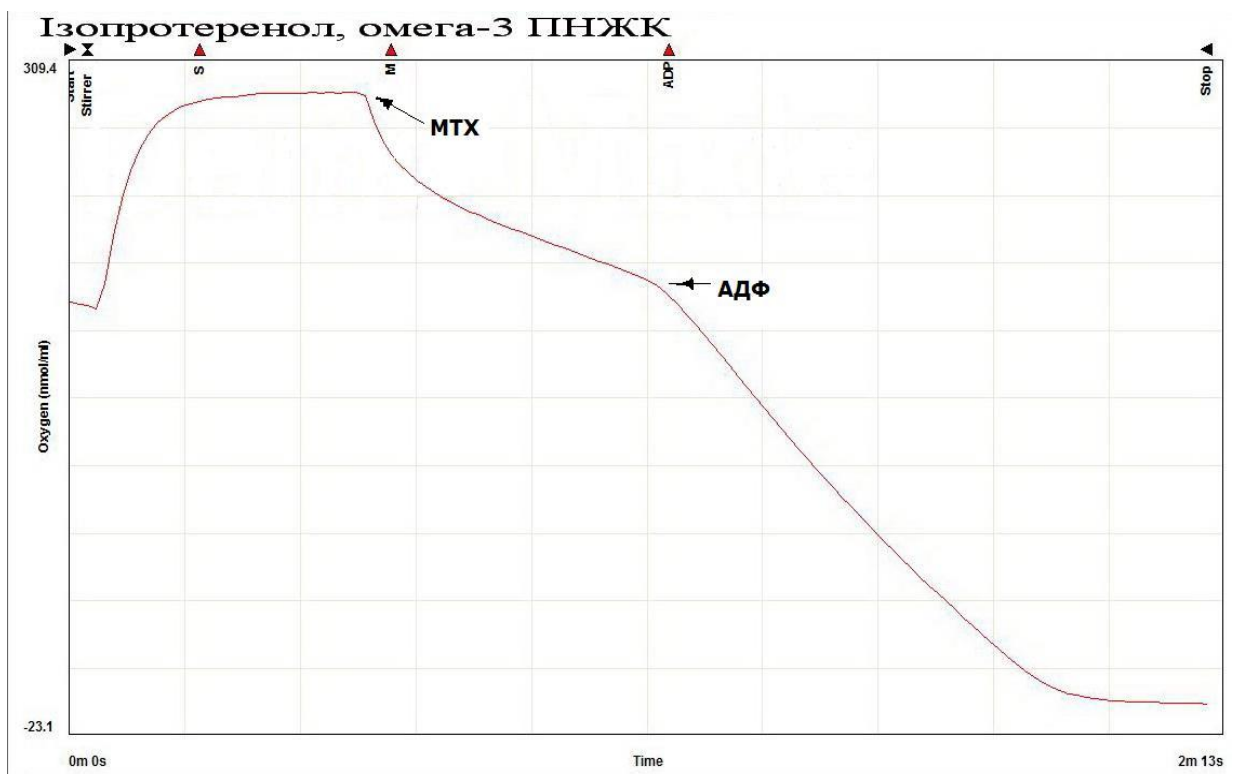
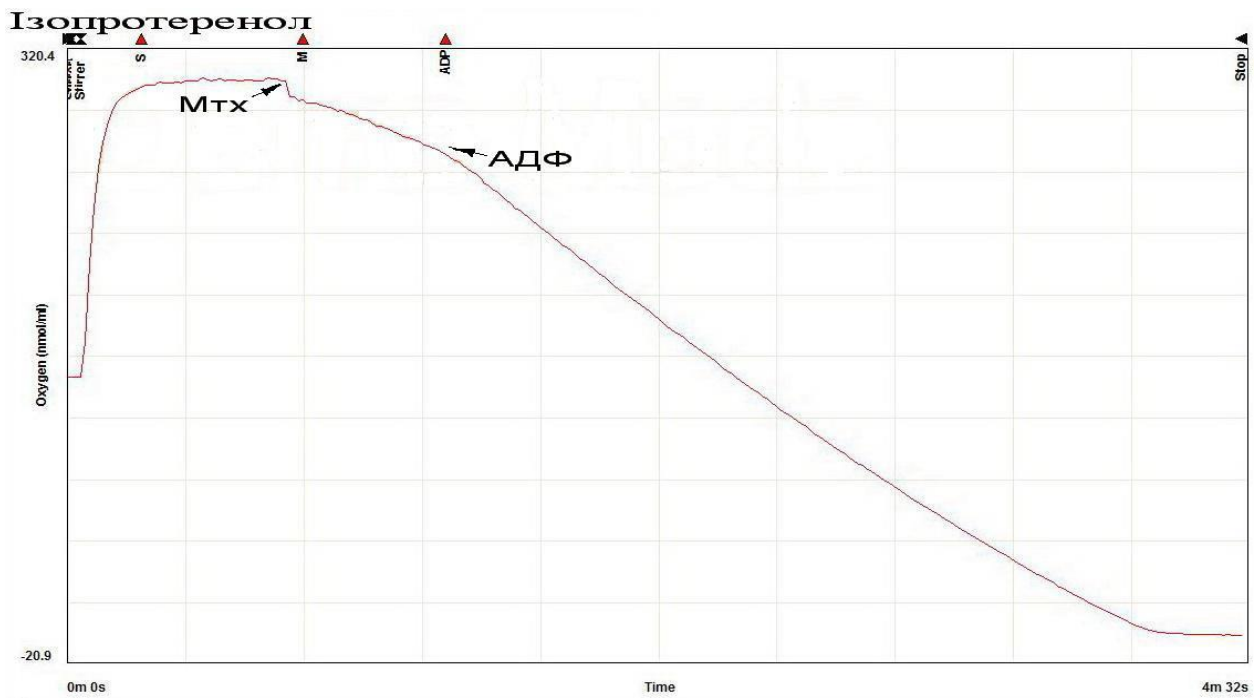
**Рис.3.1.4.** Часовий перебіг зміни оптичної щільності для ІФ та СС мітохондрій ізольованих з міокарда щурів контрольної та експериментальної групи. в безкальцієвому (відповідно 1, 2) і кальційвмісному середовищах (відповідно 3, 4). Вісь ординат — відношення показника оптичної щільності на  $n$ -ній хв. до показника на 1-й хв, вісь абсцис — час, хв.  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-4}$  M) додавали на 5-й хв (3 і 4 записи) для індукування відкриття МППП. Порівнювали ІФ та СС мітохондрії

експериментальної групи. Кожна точка даних представляє середні значення для 3 — 5 індивідуальних експериментів. \*  $p < 0,05$  проти відповідних значень ІФМ. 1 — ІФ мітохондрії експериментальної групи без кальцієвому середовищі; 2 — СС мітохондрії з експериментальної групи без кальцієвому середовищі; 3 — ІФ мітохондрії від експериментальний групи після додавання  $10^{-4}$  М  $\text{Ca}^{2+}$  на 5-й хв; 4 — СС мітохондрій від експериментальний групи після додавання  $10^{-4}$  М  $\text{Ca}^{2+}$  на 5-й хв.

### 3.2. СПОЖИВАННЯ ОМЕГА-3 ПНЖК ЗНИЖУЄ ЧУТЛИВІСТЬ МППІ ДО КАЛЬЦІЙЗАЛЕЖНОГО ПЕРЕХОДУ В СТАН ВИСОКОЇ ПРОНИКНОСТІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІЗОПРОТЕРЕНОЛІНДУКОВАНОМУ ПОШКОДЖЕННІ МІОКАРДА

#### 3.2.1. Показники дихання мітохондрій міокарда при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця щурів. Вплив споживання омега-3 ПНЖК





*Рис. 3.2.1. Нативні криві споживання кисню ізольованими мітохондріями серця щурів контрольної групи I, групи II та III*

Результати досліджень, проведених на ізольованих мітохондріях міокарду щурів (опис тварин та схема експерименту наведені в розділі **Матеріали та методи досліджень**) продемонстрували, що ізопротереноліндуковане ураження міокарда, призводить до інгібування функціонування мітохондрій міокарда внаслідок перенавантаження кардіоміоцитів та мітохондрій іонами кальція (**табл. 3.2.1.**). Так, в умовах окиснення сукцинату швидкість дихання, стимульована АДФ (у МС-3), знижувалась у середньому на 48,56% (в групі II), що свідчить про модуляцію роботи дихального ланцюга, оскільки в цьому стані швидкість дихання лімітується саме ним. Дихальний контроль за Чансом знизився на 34,56% порівняно з контрольною групою, що опосередковано може свідчити про процеси роз'єднання дихання та фосфорилування. Відношення АДФ/О достовірно зменшувалось (на 14,46%), а швидкість субстратного дихання у МС-2 зменшувалась на 39,33% порівняно з контролем. Швидкість дихання після фосфорилування АДФ (в стані 4) при ізопротереноловому ураженні достовірно не змінювалась.

Споживання щурами омега-3 ПНЖК призводило до явного відновлення показників дихання мітохондрій, ізольованих з міокарда щурів, яким вводили ізопротеренол для пошкодження міокарда (група III). Швидкість дихання, стимульована АДФ (МС-3) зростала в середньому на 70,12 %, ДК — на 45,19 %, АДФ/О — на 18,7 %, а швидкість фосфорилування в стані 2 — на 39,87 % порівняно з відповідними показниками в групі II (**таб.3.2.1.**). Швидкість дихання в МС-4 практично залишалася незмінною, як і в групі II.

*Таблиця 3.2.1. Показники дихання мітохондрій міокарда при ізопротеренол-індукованому пошкодженні міокарда за наявності в середовищі інкубації сукцинату в різних функціональних станах*

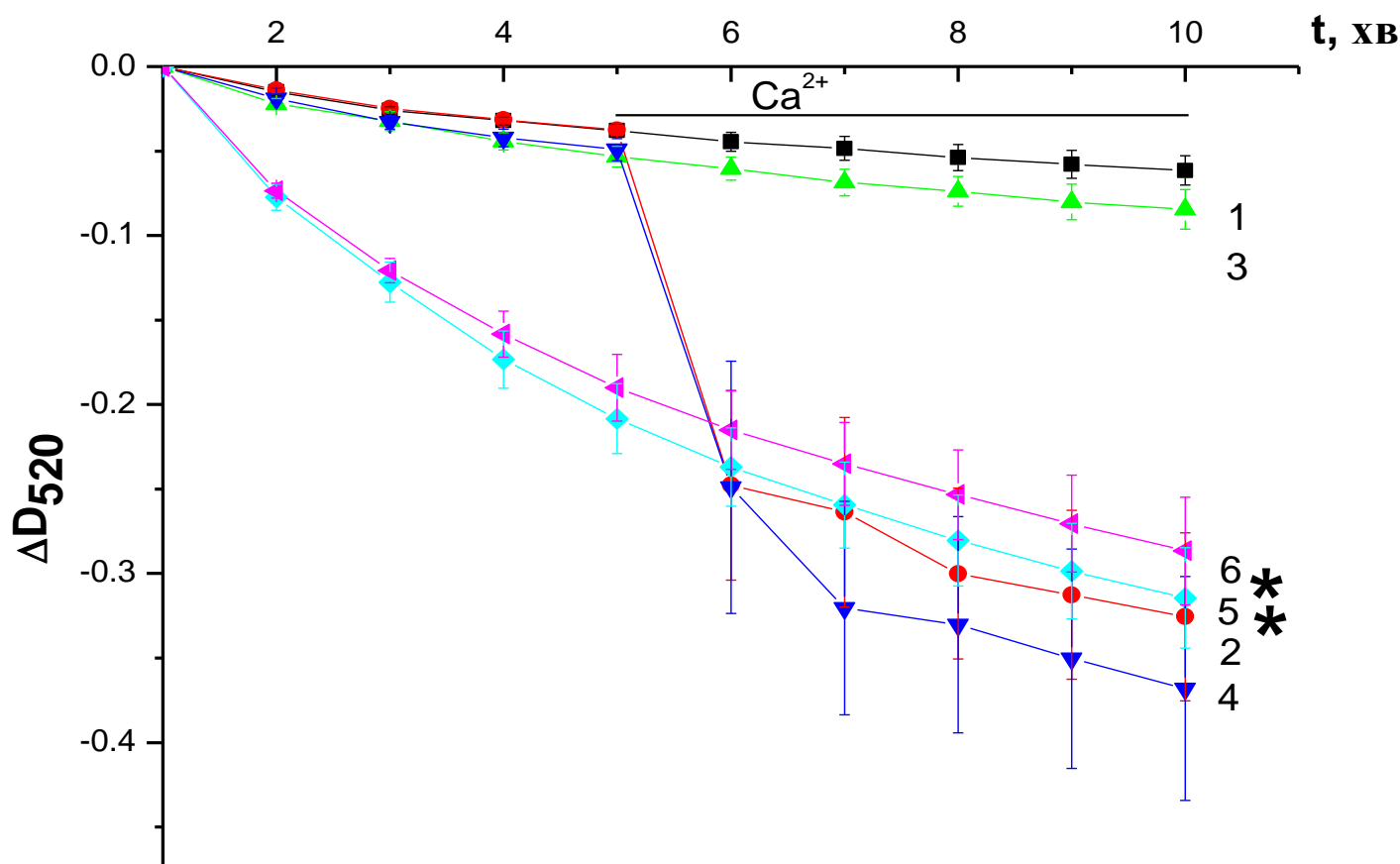


Показники	Контроль (I група)	Ізопротеренол (II група)	Ізопротеренол та ω-3 ПНЖК (III група)
Швидкість поглинання кисню у стані відносного спокою (МС-2)	103,85 ± 11,37	63 ± 6,28*	88,12 ± 8,2**
фосфорилуючого (МС-3)	228,85 ± 19,26	117,71 ± 10,63*	200,25 ± 26,81**
контрольованого (МС-4)	43,14 ± 4,36	38,71 ± 4,47	38,71 ± 6,98
(нмоль O <sub>2</sub> · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка)			
Дихальний контроль (МС-3/МС-4)	5,41 ± 0,32	3,54 ± 0,22*	5,14 ± 0,3**
Коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О)	1,59 ± 0,04	1,39 ± 0,05*	1,65 ± 0,05**

Примітка.\* — різниця достовірна (p<0,05) у порівнянні з контролем, \*\* — різниця достовірна (p<0,05) у порівнянні з показниками групи II.

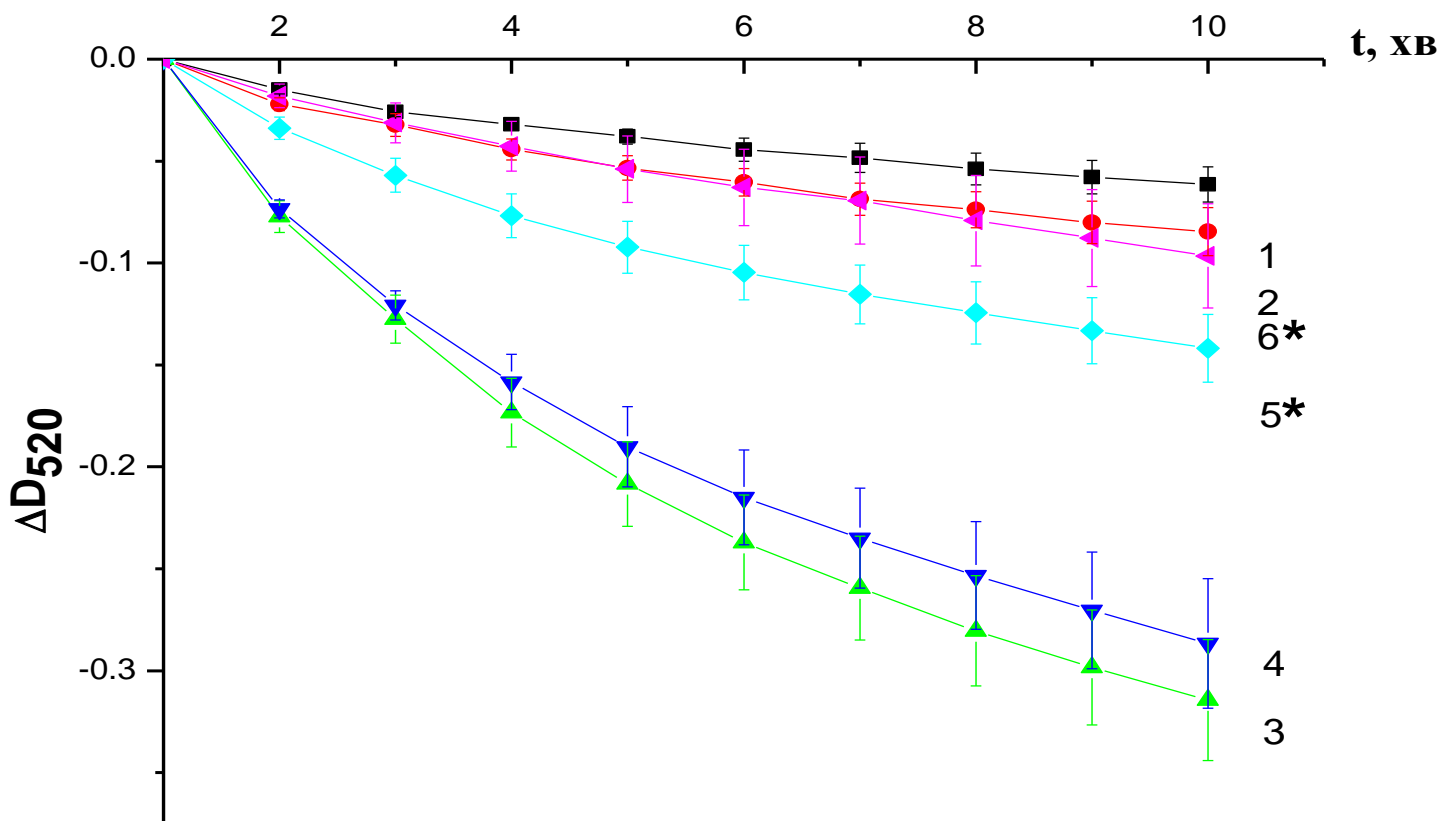
### 3.2.2. Набухання субсарколемальних та інтерфібрилярних мітохондрій при експериментальному ізопротереноліндукованому пошкодженні міокарда в умовах попереднього споживання омега-3 ПНЖК

При порівнянні результатів, отриманих щодо ІФМ- та ССМ-фракцій, спостерігалась достовірна зміна оптичної щільності при 520 нм за відсутності індуктора відкривання МППП  $\text{Ca}^{2+}$ . Контрольне значення  $\Delta D$  змінювалось від  $0,06 \pm 0,01$  в контрольній групі до  $0,31 \pm 0,03$  в групі ІІ для СС- (рис.3.2.2. записи 1



*Рис.3.2.2. Часова залежність оптичної щільності суспензії мітохондрій виділених з контрольних та експериментальних сердець тварин (вісь ординат — різниця показників оптичної щільності між n-ю хвилиною та 1-ю, вісь абсцис —*

час, хв.): 1 — субсарколемальні мітохондрії (ССМ), контроль; 2 — ССМ, контроль, додавання кальцію ( $10^{-4}$  M) на 5-й хв; 3 — інтерфібрилярні мітохондрії (ІФМ), контроль; 4 — ІФМ, контроль, додавання кальцію ( $10^{-4}$  M) на 5-й хв; 5 — ССМ, група з ізопротереноліндукованим (ІІ) пошкодженням міокарда; 6 — ІФМ, група з ІІ пошкодженням міокарда; \*  $p < 0,05$  у порівняннях з відповідною контрольною групою



**Рис.3.2.3.** Часова залежність оптичної щільності суспензії мітохондрій виділених з контрольних та експериментальних сердець тварин: вісь ординат — різниця показників оптичної щільності між n-ю хвилиною та 1-ю, вісь абсцис — час, хв. 1 — ССМ, контроль; 2 — ІФМ, контроль; 3 — ССМ, група щури з

ізопротереноліндукованим пошкодженням міокарда; **4** — ІФМ, група щури з ізопротереноліндукованим пошкодженням міокарда; **5** — ССМ, група з ізопротереноліндукованим пошкодженням міокарда за впливу омега-3 ПНЖК; **6** — ІФМ, група з ізопротереноліндукованим пошкодженням міокарда за впливу омега-3 ПНЖК; \*  $p < 0,05$  у порівнянні з відповідною контрольною групою

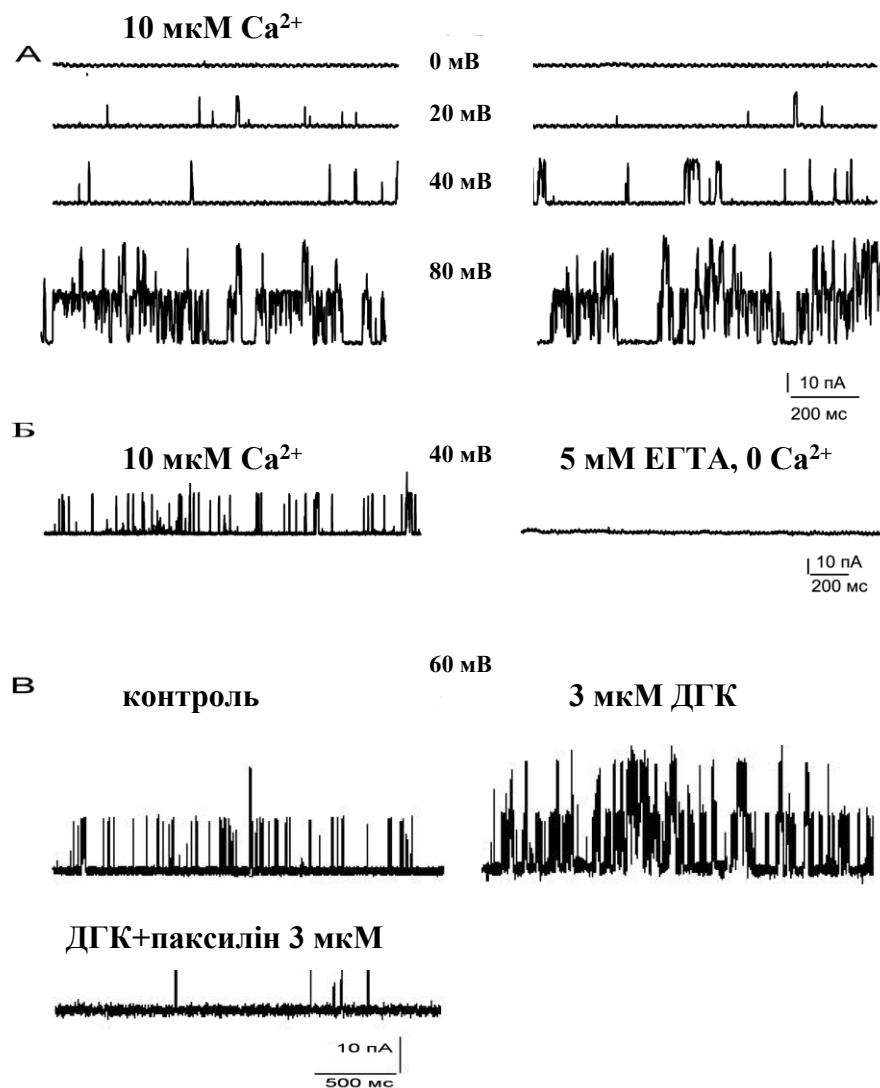
та **5**) та від  $0,08 \pm 0,01$  в контролі до  $0,29 \pm 0,03$  в групі II для ІФ-фракцій (рис.3.2.2. записи **3** та **6**). Вірогідної різниці між реакціями СС- та ІФ- фракцій при ізопротереноліндукованому пошкодженні в наших дослідах, проте, виявлено не було (рис.3.2.2. записи **5** та **6**). Варто зазначити, що те зниження оптичної щільності, яке спостерігали при ізопротереноліндукованому пошкодженні міокарда, було подібне до такого при дії високих концентраціях кальцію. В умовах навантаження контрольних мітохондрій кальцієм відбувалося зниження оптичної щільності до показників  $\Delta D$   $0,33 \pm 0,05$  для СС- та  $0,37 \pm 0,66$  для ІФ-мітохондрій (рис.3.2.2. записи **2** та **4**).

Наступним завданням роботи було з'ясувати, чи здійснюють захисний вплив омега-3 ПНЖК на мітохондрії міокарда при ізопротереноліндукованому пошкодженні, а також чи залежить інтенсивність можливого ефекту від різновиду фракції мітохондрій. Виявилось, що після попереднього тривалого споживання омега-3 ПНЖК ізопротереноліндуковане пошкодження міокарда супроводжується менш інтенсивним кальційнезалежним набуханням мітохондрій групи III (на 54,84 % для СС- та на 65,52 % для ІФ-фракції у порівнянні з групою II. Значення  $\Delta D$  падало в середньому з  $0,31 \pm 0,03$  до  $0,14 \pm 0,02$  для ССМ (рис. 3.2.3. записи **3** та **5**) та з  $0,29 \pm 0,03$  до  $0,11 \pm 0,03$  для ІФМ відповідно (рис. 3.2.3. записи **4** та **6**). Отже,після тривалого споживання омега-3 ПНЖК інтерфібрилярна фракція менш чутлива до набухання у відповідь на додавання кальцію порівняно з аналогічним феноменом субсарколемальної фракції мітохондрій в умовах ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда.

### 3.3. ПОСИЛЕННЯ АКТИВНОСТІ ВКСa-КАНАЛІВ ВНУТРІШНЬОЇ МЕМБРАНИ МІТОХОНДРІЙ КАРДІАЛЬНИХ КЛІТИН HL-1 ПІД ВПЛИВОМ ОМЕГА-3 ПНЖК

Для подальшого дослідження мітохондріальних механізмів, у кардіопротекторної дії омега-3 ПНЖК, ми провели серію експериментів на ізольованих мітопластах з метою виявлення впливу омега-3 ПНЖК на електричну активність внутрішньої мембрани мітохондрій HL-1-клітин; останні є клітинно лінійою кардіоміоцитів мишачого походження. Для забезпечення фізичного доступу до внутрішньої мембрани, зовнішня мембрана мітохондрій була повністю або частково відокремлена процедурою гіпотонічного шоку, в результаті утворювались так звані мітопласти. Застосування конфігурації mitoplast-attached до ізольованих мітопластів в симетричних за калієм (150 мМ) розчинах дозволило виявити струми через поодинокі канали великої провідності (~300 пС). При збільшенні значень підтримуваного потенціалу від +20 до +80 мВ, активність каналу збільшувалася (рис. 3.3. А), що свідчить про потенціалзалежність його функції. Суперфузія мітопластів розчином, що вміщував 1,0 мМ ЕГТА без додавання  $\text{Ca}^{2+}$ , призводила до пригнічення поодинокі активності. Цей факт свідчить про те, що активність каналу є залежною від присутності  $\text{Ca}^{2+}$  в зовнішньому розчині.

Додавання такого представника омега-3 ПНЖК, як докозагексаєнової кислоти, до ізольованих мітопластів зумовлювало потенціацію активності поодинокіх ВКСa-каналів при фіксованих рівнях потенціалу і концентрації кальцію без суттєвих змін амплітуди струмів через канали. Додавання 1,0 мкМ паксиліну — селективного інгібітора ВКСa-каналів — призводило до пригнічення активності таких каналів (рис. 3.4. Б). Таким чином, отримані результати дозволили ідентифікувати функціональну активність ВКСa-каналів у внутрішній мембрані мітохондрій кардіальних клітин і продемонструвати, що омега-3 ПНЖК здійснюють прямий потенціюючий вплив на активність таких каналів.



**Рис.3.3.1.** ДГК збільшує активність ВКСа-каналів внутрішньої мембрани мітохондрій кардіальних клітин НІ-1.

*А* — струми через ВКСа-канали внутрішньої мітохондріальної мембрани НІ-1 клітин при різних підтримуючих потенціалах. Конфігурація «mitoplast-attached». Активність каналу збільшується при збільшенні значень потенціалу фіксації від +20 до +80 мВ, що свідчить про потенціалзалежність каналу. *Б* — струми через ВКСа-канали внутрішньої мітохондріальної мембрани в

присутності 10 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  та після хелатування  $\text{Ca}^{2+}$ . Підтримуваний потенціал +40 мВ. **В** — струми через ВКСа-канали внутрішньої мітохондріальної мембрани за контрольних умов (контроль) та після додавання у розчин 3 мкМ ДГК (праворуч) та ДГК в комбінації з паксиліном (знизу).

### **3.4. ЗАЛУЧЕННЯ ВКСа-КАНАЛІВ В ЕФЕКТИ ОМЕГА-3 ПНЖК ЩОДО ПАРАМЕТРІВ ДИХАННЯ МІТОХОНДРІЙ МІОКАРДА ПРИ ВИСОКИХ КОНЦЕНТРАЦІЯХ КАЛЬЦІЮ**

Ми припустили, що захисний вплив омега-3 ПНЖК проти  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого пошкодження мітохондрій опосередкований дією на ВКСа-канали. Для порівняння дії цих двох факторів (омега-3 ПНЖК та ВКСа-каналів) на параметри дихання мітохондрій при  $\text{Ca}^{2+}$ -ПНВ (10 мкМ) було досліджено:

1. можливість захисної дії активатора ВКСа-каналів NS1619 ( $30 \cdot 10^{-5}$  М) та можливість усунення цього ефекту блокатором ВКСа-каналів паксиліном (1,0 мкМ);
2. усунення блокатором ВКСа-каналів паксиліном (1,0 мкМ) захисної дії омега-3 ПНЖК.

Концентрація кальцію 100 мкМ, яка застосовувалась в **розділі 3.1.** при реєстрації набухання мітохондрій, виявилась занадто великою при дослідженні дихання і необоротно пошкоджувала мітохондрії так, що вони майже не поглинали кисень. Тому в цьому розділі була використана концентрація  $\text{Ca}^{2+} 10^{-5}$  мкМ.

У цих аспектах були отримані наступні результати, наведені в **табл.3.4.1.** Кальцій (10 мкМ) в наших дослідах достовірно знижував швидкість дихання в МС-3 та підвищував швидкість дихання в МС-4 порівняно з контролем. ДК в цьому разі достовірно знижувався, але відношення АДФ/О не змінювалось порівняно з контролем.

Узгоджуючись з даними літератури [91], активатор ВКСа-каналів NS1619 підвищував швидкість в МС-2 та МС-4, та зменшував ДК порівняно з контролем. Швидкість дихання в МС-3 в наших дослідах істотно не змінювалась.

При комбінованій дії активатору ВКСа-каналів та  $\text{Ca}^{2+}$ , NS1619 не попереджав негативний вплив кальцію на швидкість дихання в МС-3, але блокував дію кальцію при МС-4 та, відповідно, ДК.

Застосування докозагексаєнової кислоти (ДГК, 3,0 мкМ), тобто представника омега-3 ПНЖК, в наших досліджах зменшувало швидкість дихання в МС-3 та значення ДК; при цьому швидкість дихання в МС-4 та відношення АДФ/О не змінювалось.

Одночасна дія омега-3 ПНЖК та кальцію (10 мкМ) попереджувала зменшення швидкості дихання в МС-3 та ДК та не допускала зростання швидкості дихання в МС-4.

Інгібітор ВКСа-каналів паксилін (1,0 мкМ) не попереджував зменшення швидкості дихання в МС-3 (у відповідь на дію  $\text{Ca}^{2+}$  за наявності NS1619), але відміняв захисний вплив NS1619 при МС-4 та дію на ДК.

За умов одночасного впливу ДГК та кальцію, паксилін попередив захисну дію ДГК на показник ДК.

Отже, результати наших досліджень вказують на подібність впливів омега-3 ПНЖК і NS1619 на параметри дихання мітохондрій міокарда. Так, в наших експериментах ДГК і NS1619 попереджували зростання швидкості дихання в МС-4 та запобігали падінню ДК при дії  $\text{Ca}^{2+}$  порівняно з ефектами ізольованої дії  $\text{Ca}^{2+}$ . Якщо ж до цих факторів додати інгібітор ВКСа-каналів паксилін, тобто порівнювати групи (паксилін + NS1619 +  $\text{Ca}^{2+}$ ) та (паксилін + ДГК +  $\text{Ca}^{2+}$ ), то паксилін відміняв захисну дію і NS1619 і ДГК на ДК в умовах впливу  $\text{Ca}^{2+}$ .

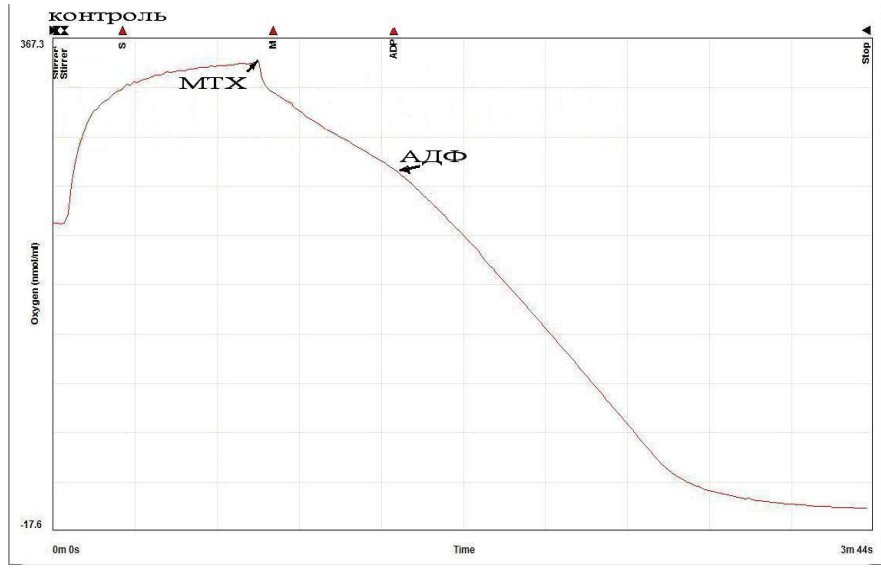
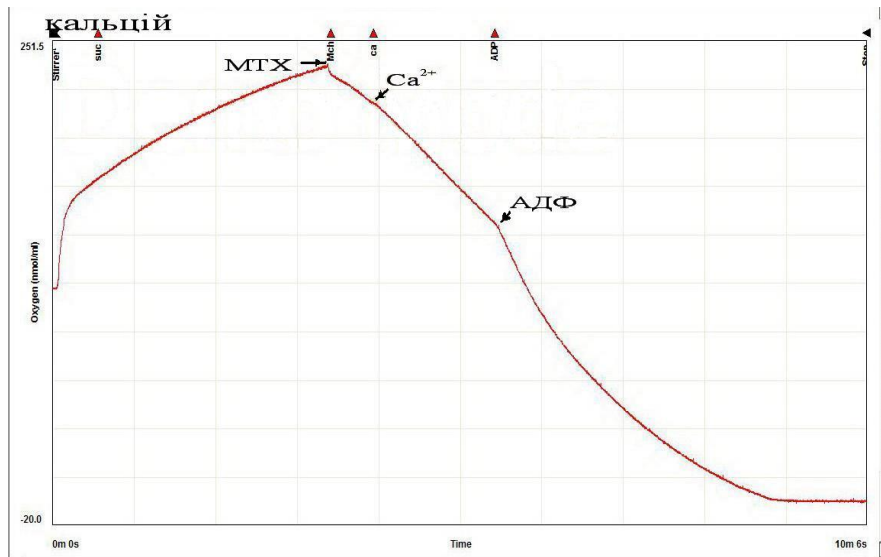
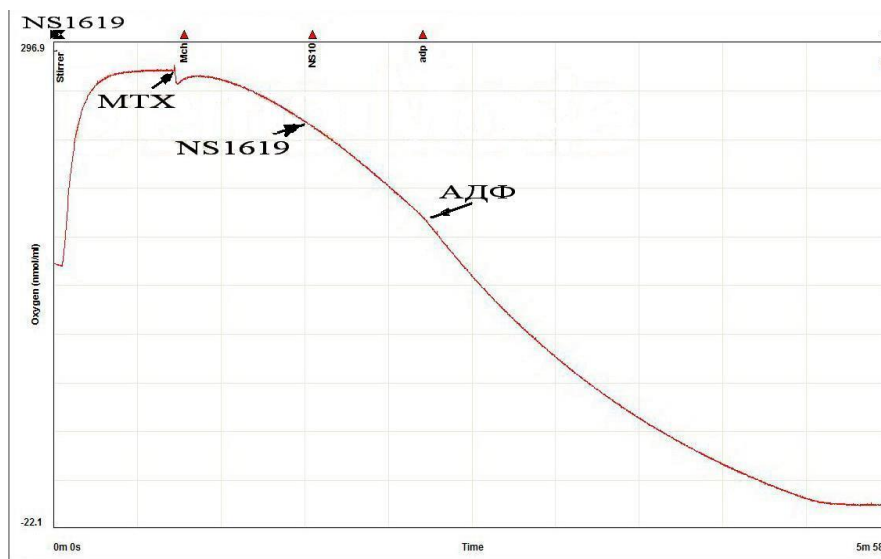
При цьому, проте, спостережувані ефекти демонстрували і певні відмінності. Тільки ДГК попереджувала падіння швидкості дихання в МС-3 при Са-ПНВ, але не NS1619; при МС-4 паксилін відміняв захисну дію NS1619 при Са-ПНВ, але не ДГК; паксилін знизив відношення АДФ/О за умов впливу NS1619 при Са-ПНВ, але не при дії ДГК



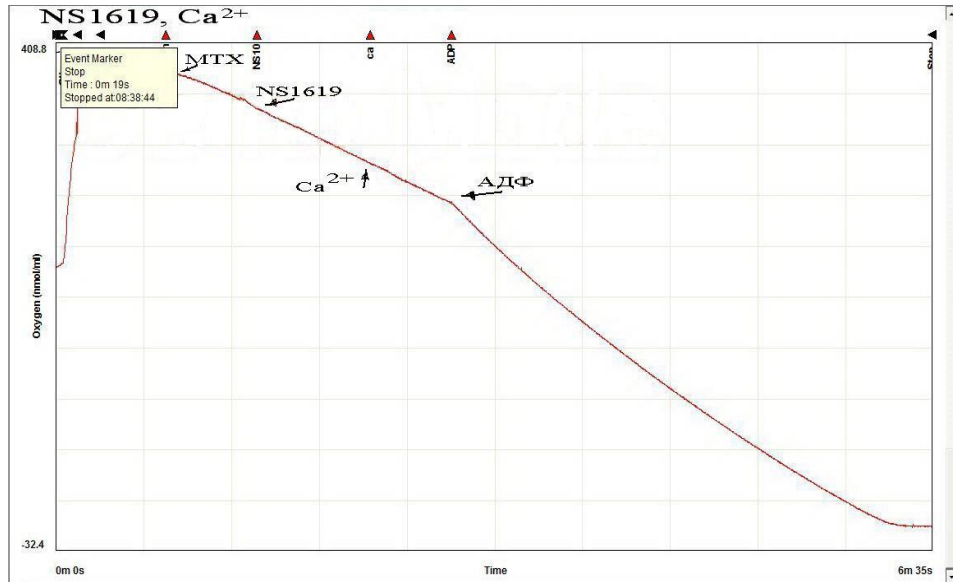
	Швидкість споживання кисню без АДФ, нмоль $O_2$ хв <sup>-1</sup> мг <sup>-1</sup> білка (МС-2)	Швидкість фосфорилуючого дихання мітохондрій (у МС-3), нмоль $O_2$ хв <sup>-1</sup> мг <sup>-1</sup> білка	Швидкість контрольованого дихання мітохондрій (в МС-4), нмоль хв <sup>-1</sup> мг <sup>-1</sup> білка	Коефіцієнт дихального контролю за Чансом	Коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О)
Вихідний стан	44,19±2,24	99,79 ±6,82	22,26±1,5	4,54±0,2	1,78±0,02
Дія кальцію (10 <sup>-5</sup> М)	40,33±4,31	79,58±3,87	35,08±4,96	2,58±0,21	1,75±0,01
Дія NS1619 (30·10 <sup>-6</sup> М)	53,18±4,38	86,1±7,31	31,3±5,82	2,69±0,28	1,72±0,01
Дія NS1619 (30·10 <sup>-6</sup> М) за наявності Ca <sup>2+</sup> (10 <sup>-5</sup> М)	48,18±6,78	73,25±10,98	17,87±1,27	3,61±0,41	1,74±0,01

Дія паксиліну ( $10^{-6}$ М) за наявності NS1619 ( $30 \cdot 10^{-6}$ М) та $\text{Ca}^{2+}$ ( $10^{-5}$ М)	49,62±2,49	68,87±6,12	35±5,82	2,11±0,17	1,05±0,05
Дія ДГК ( $3 \cdot 10^{-6}$ М)	34,25±4,83	61,75±5,29	23,5±4,23	3,2±0,35	1,78±0,02
Дія ДГК ( $3 \cdot 10^{-6}$ М) за наявності $\text{Ca}^{2+}$ ( $10^{-5}$ М)	39,09±3,65	58±3,69	28,78±4,41	3,35±0,31	1,76±0,02
Дія паксиліну за наявності ДГК ( $3 \cdot 10^{-6}$ М) та $\text{Ca}^{2+}$ ( $10^{-5}$ М)	42,12±4,29	63,62±4,9	23,91±3,14	2,28±0,13	1,73±0,01

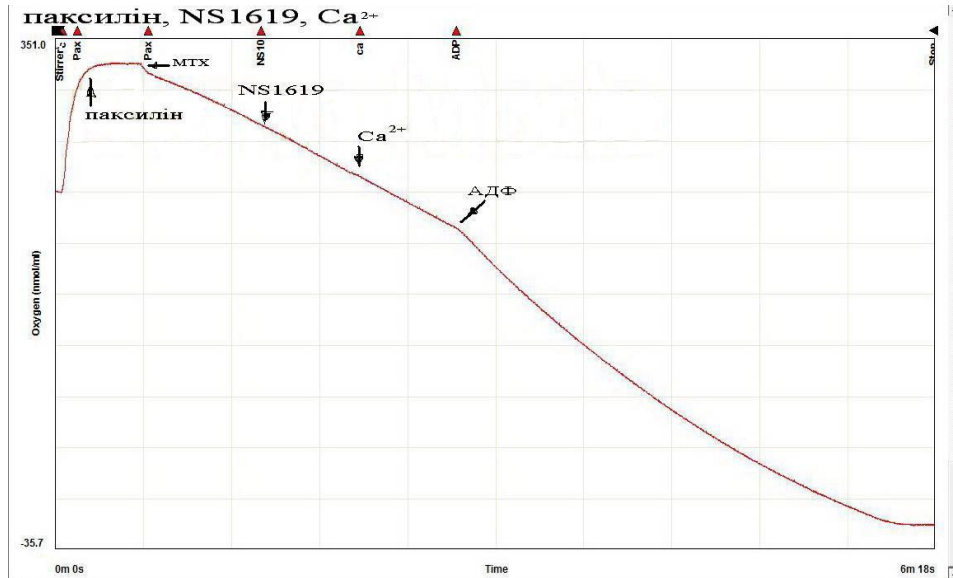
*Таблиця 3.4.1. Показники дихання мітохондрій міокарда при  $\text{Ca}^{2+}$  перенавантаженні в різних функціональних станах за умов впливу активатора ВКСа каналів та ДГК*

**A****Б****В**

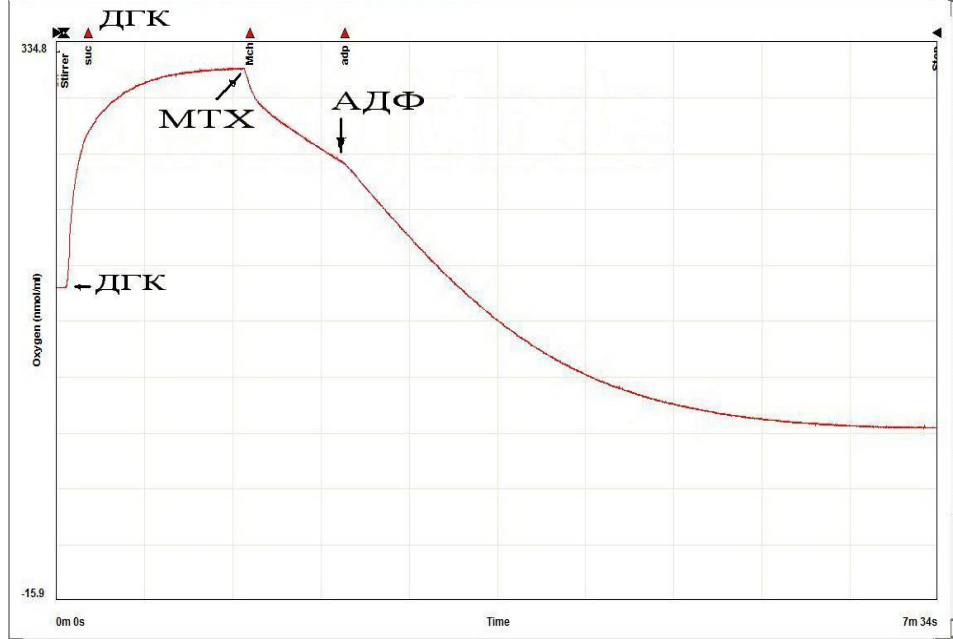
Г

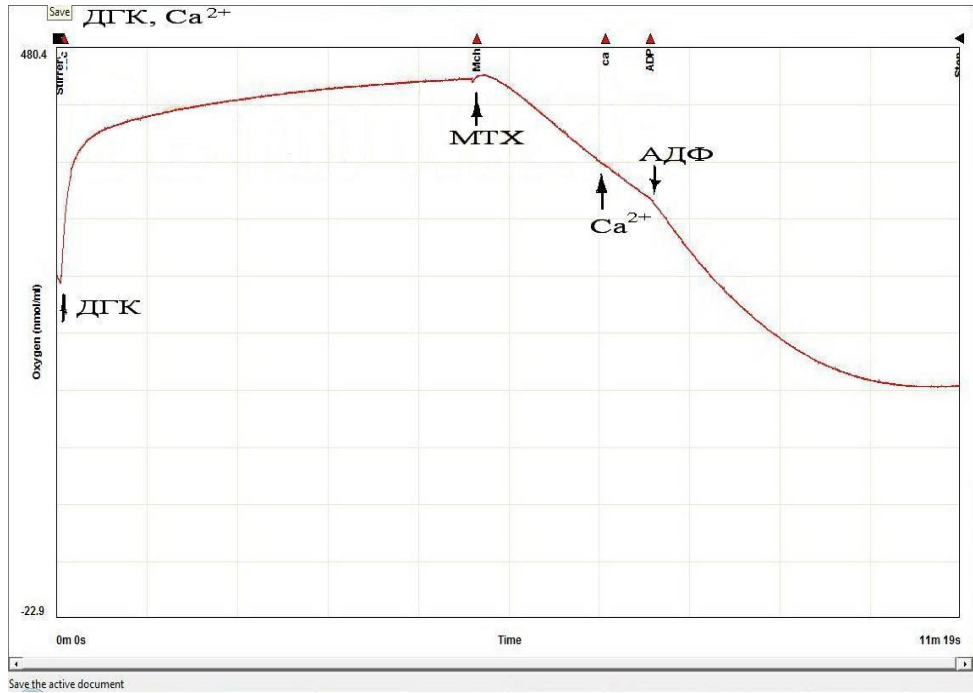
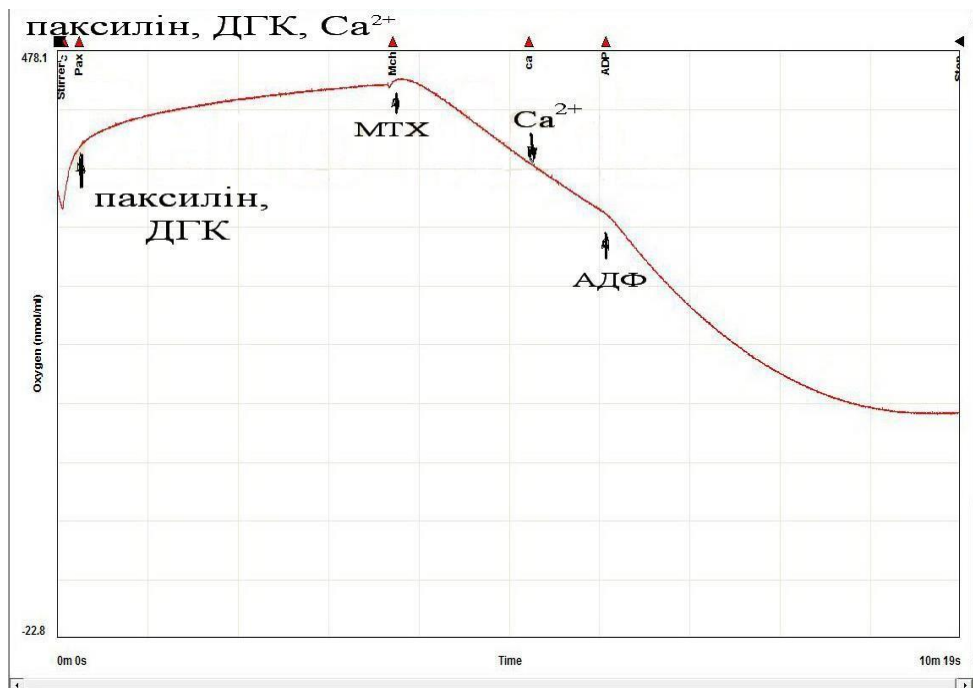


Д



Е



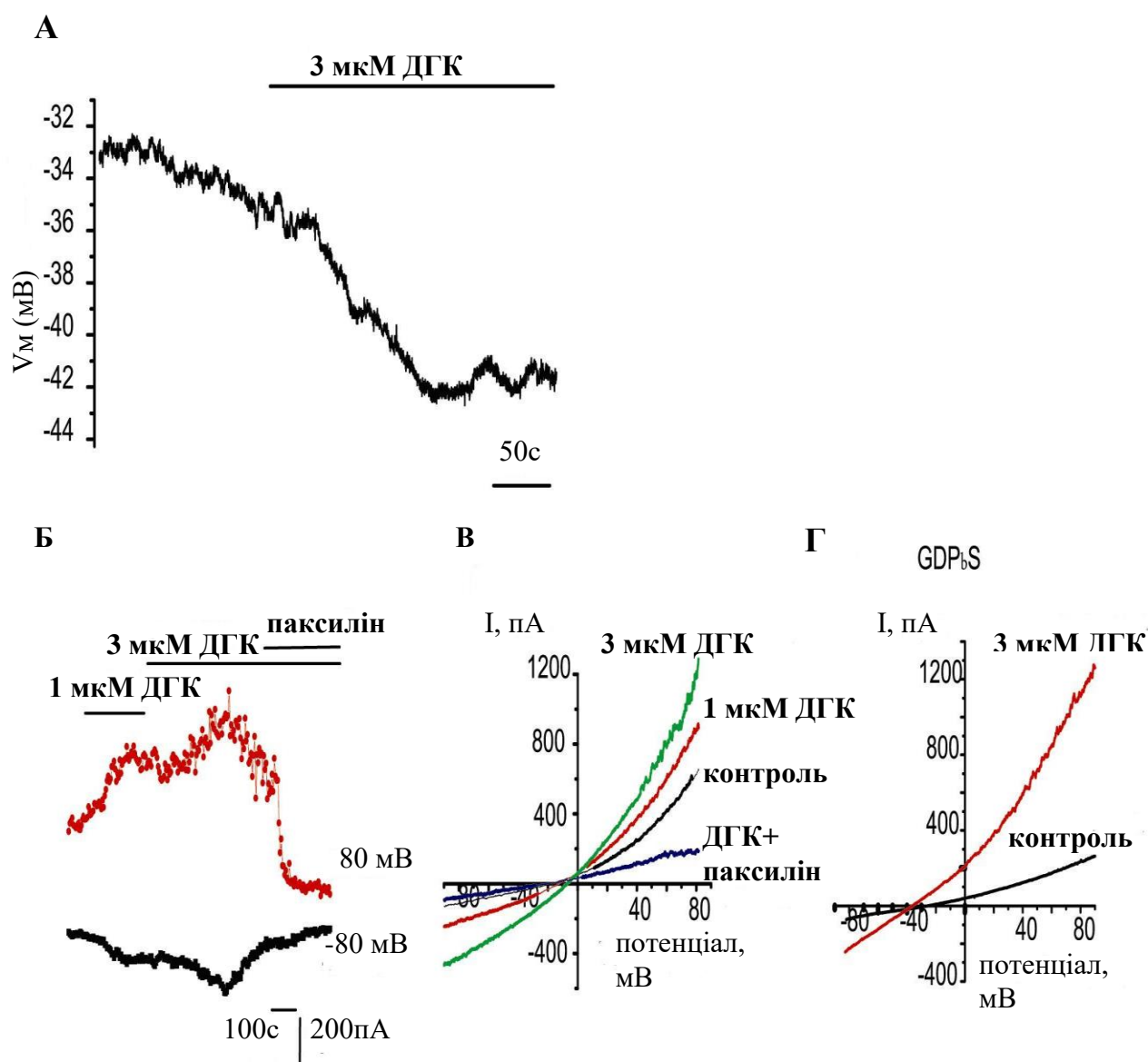
**Ж****З**

**Рис. 3.4.1.** Нативні криві споживання кисню мітохондріями серця щурів. **А** — контроль; **Б** — дія кальцію, **В** — NS1619, **Г** — дія 1619 та кальцію; **Д** — паксилін,

*NS1619 та кальцій; E — дія ДГК; Ж — сумісна дія ДГК та кальцію, З — паксилін, ДГК та кальцій.*

### 3.5. НАЯВНІСТЬ МЕМБРАННОГО ХОЛЕСТЕРИНУ ЗАБЕЗПЕЧУЄ СТИМУЛЮЮЧИЙ ВПЛИВ ОМЕГА-3 ПНЖК НА АКТИВНІСТЬ ВКСa-КАНАЛІВ

#### 3.5.1. Під дією докозагексаєнової кислоти ендотеліальні клітини гіперполяризуються завдяки стимуляції ВКСa-каналів



**Рис.3.5.1.** Впливи ДГК на електричну відповідь ендотеліальних клітин EA.hy926. А — ефект ДГК (3,0 мкМ) щодо мембранного потенціала ендотеліальних клітин.

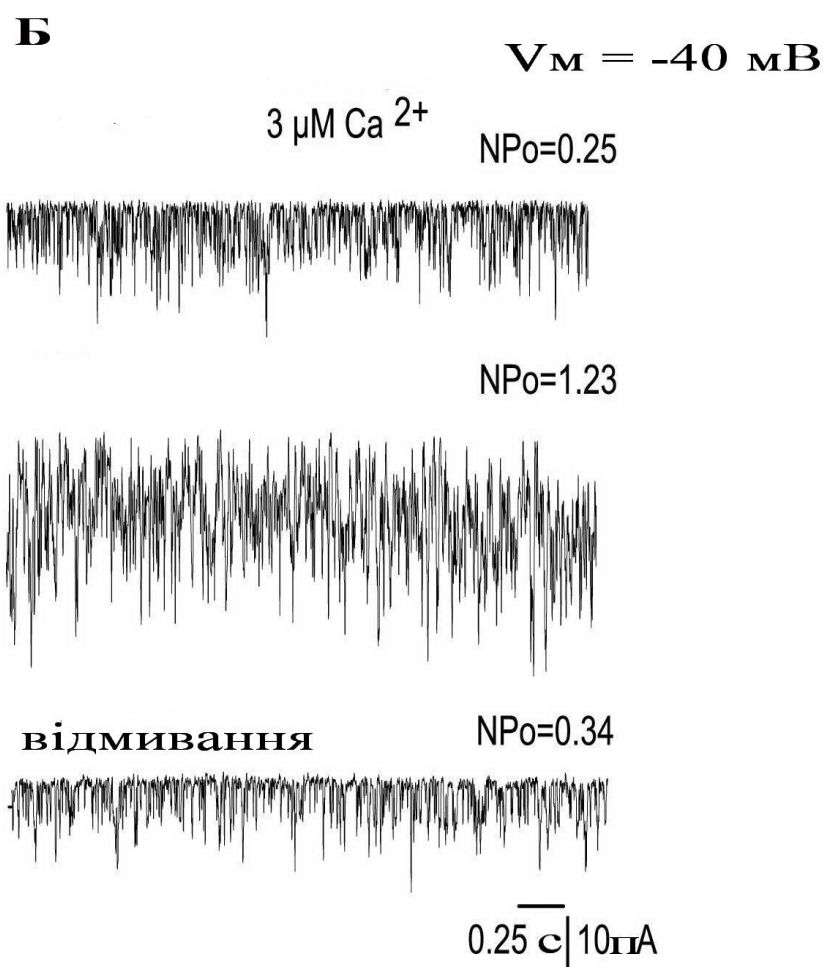
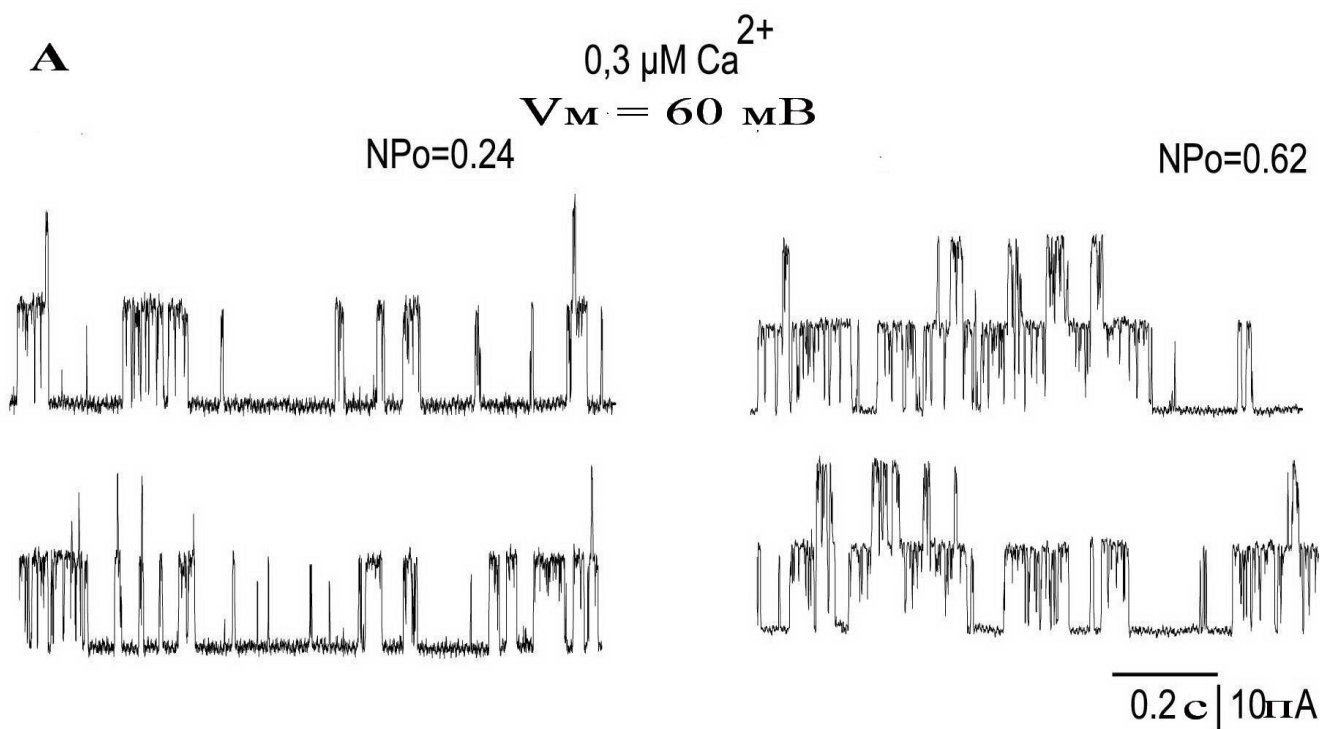
**Б, В** — мембранні струми в конфігурації «whole cell» ( $n=5$ ), викликані рамповими змінами напруги до (контроль) та після застосування 1,0 або 3,0 мкМ ДГК самостійно або в комбінації з 2,0 мкМ паксиліну. **Г** — ефект внутрішньоклітинної перфузії GDP $\beta$ S, інгібітором G білку, на ДГК-викликану потенціацію мембранних струмів в конфігурації «whole cell», викликаних рампами напруги ( $n=4$ ).

Мембранний потенціал спокою ендотеліальних клітин складав у середньому  $-32,6 \pm 2,1$  мВ ( $n=17$ ). У присутності 3,0 мкМ ДГК в зовнішньоклітинному розчині мембрана цих клітин гіперполяризувалася повільно, в середньому на  $9,1 \pm 1,5$  мВ ( $n=5$ ) (рис. 3.5.1. А). В режимі фіксації потенціалу застосування 3,0 мкМ ДГК викликало струм вихідного випрямлення у відповідь на рампові зміни напруги від -90 до +80 мВ ( $n=5$ ) (рис. 3.5.1. Б, В). Викликані струми блокувались під дією 1,0 мкМ паксиліну, селективного інгібітора ВКСа-каналів (рис. 3.5.1. Б, В).

G-білок-зв'язаний рецептор 120 (GPR120) був нещодавно ідентифікований як омега-3 ПНЖК рецептор [136]. Щоб дослідити механізм, що лежить в основі дії стимулювання ВКСа каналів і з'ясувати роль G-білокспряженого рецептора (GPCR) в цьому ефекті, використовували піпеточний розчин, що містив 1 мМ GDP- $\beta$ S, інгібітор G-білку. За цих умов, потенціюючий ефект ДГК на вихідні струми зберігався (рис. 3.5.1. Г), вказуючи на те, що GPR120 та інші GPCR не потрібні для стимулюючої дії ДГК на ендотеліальні ВКСа-канали.

### **3.5.2. ДГК збільшує активність ВКСа-каналів ендотеліальних клітин в конфігурації «inside-out»**

Так як збільшення амплітуди струмів ВКСа-каналів при додаванні ДГК в конфігурації «whole-cell» може бути спричинене або зростанням



*Рис.3.5.2. ДГК активують одноканальну активність BKCa-каналів. Експерименти проведені на лінії ендотеліальних клітин лінії EA.hy926, що*



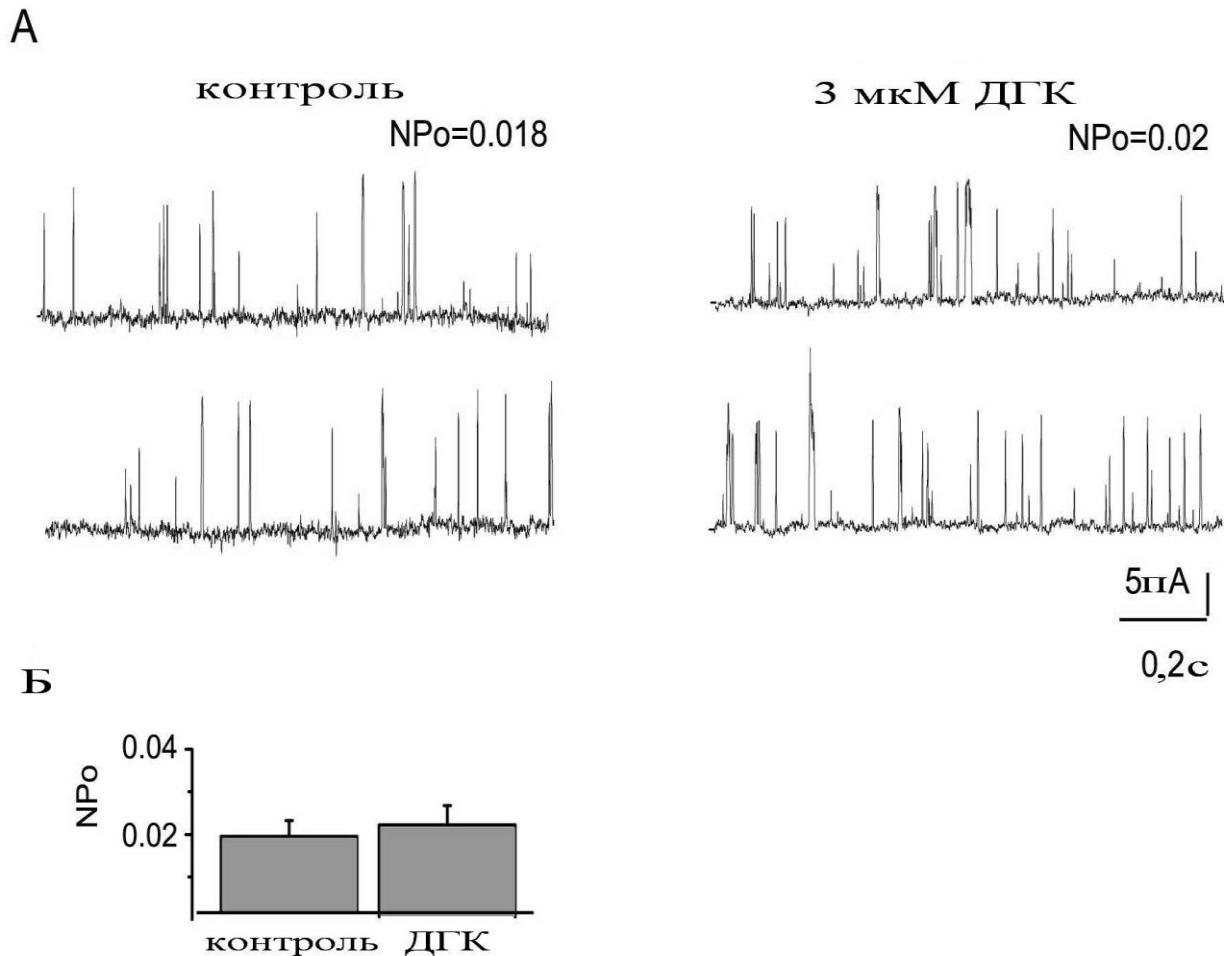
ендогенно експресують ВКСа-канали. Конфігурація «inside-out». А Вплив ДГК на активність поодиноких ВКСа-каналів. Ліворуч — контрольні записи активності двох каналів. Праворуч — активність каналів в присутності 3,0 мкМ ДГК. Зовнішньоклітинний розчин містив 0,3 мкМ вільного  $Ca^{2+}$ , підтримуваний потенціал +60 мВ. Б. – Вплив ДГК на активність ВКСа-каналів є зворотнім та зберігається при фізіологічних значеннях мембранного потенціалу. Реєстрація здійснена в конфігурації «inside-out» при підтримуваному потенціалі -40 мВ в присутності 3,0 мкМ вільного  $Ca^{2+}$  до (контроль) та після додавання 3,0 мкМ ДГК, а також після 10-хвилинного відмивання ДГК.

субплазмалемального  $Ca^{2+}$  (завдяки  $Ca^{2+}$  входу) або змінам в кальцієвій чи потенціалчутливості каналу, ми надалі дослідили вплив ДГК на активність поодиноких каналів в конфігурації петч-клямпу «inside-out» при фіксованих потенціалі та концентрації  $Ca^{2+}$ . **Рис. 3.5.2.А** ілюструє активність поодиноких ВКСа-каналів, записаних в при +40 мВ в присутності 0,3 мкМ вільного  $Ca^{2+}$  до (зліва) та після (зправа) застосування 3,0 мкМ ДГК до внутрішньої поверхні петчу. За цих умов, ДГК збільшувала  $NP_o$  без значного впливу на амплітуду струму поодинокого каналу. Ефект ДГК на активність ВКСа-каналів спостерігався також в петчах, які містили тільки один активний петч і ступінь зростання  $NP_o$  був подібним до зростання  $P_o$ , вказуючи на те, що зростання  $NP_o$  в багатоканальних петчах відбувається скоріше завдяки зростанню  $NP_o$  окремих петчів ніж зростанню кількості активних петчів. Ефект ДГК на активність ВКСа-каналів спостерігався також при негативних потенціалах (**рис. 3.5.2. Б**), був тривалим та повністю зворотним після 10 хв відмивання препарату.

### **3.5.3. Стимулюючий ефект ДГК на функцію ВКСа-каналів детермінується наявністю мембранного холестерина**

Рецепторнезалежний вплив ДГК на функцію ВКСа-каналів може бути як наслідком прямої взаємодії молекул ДГК із структурними компонентами ВКСа-каналу, так і результатом змін біофізичних властивостей ліпідного бішару

мембрани. В пошуках механізму, завдяки якому яким ДГК активує ВКСа-канали, ми дослідили, чи спроможна ДГК активувати ВКСа-канали після руйнування ліпідних рафтів (за допомогою преінкубації клітин у розчині, що містить 0,5 мМ МЦД)



**Рис.3.5.3.** Виснаження мембранного холестерину попереджає стимулюючий ефект ДГК на активність ВКСа-каналів. **А** — типові записи активності поодиноких ВКСа-каналів після преінкубації клітин EA.hy926 у розчині, що містить 0,5 мМ МЦД за контрольних умов (ліворуч) та після (праворуч) додавання 3,0 мкМ ДГК у зовнішній розчин. Підтримуваний потенціал  $V_m=60$  мВ, зовнішній розчин містив 0,3 мкМ вільного  $Ca^{2+}$ . **Б** — Статистична презентація

значень  $NP_o$  після хелатування холестерину у відсутності (контроль) (0,3 мкМ  $Ca^{2+}$ ,  $V_m=60$  мВ) та присутності ДГК. Клітини преінкубували з метилциклодекстрином

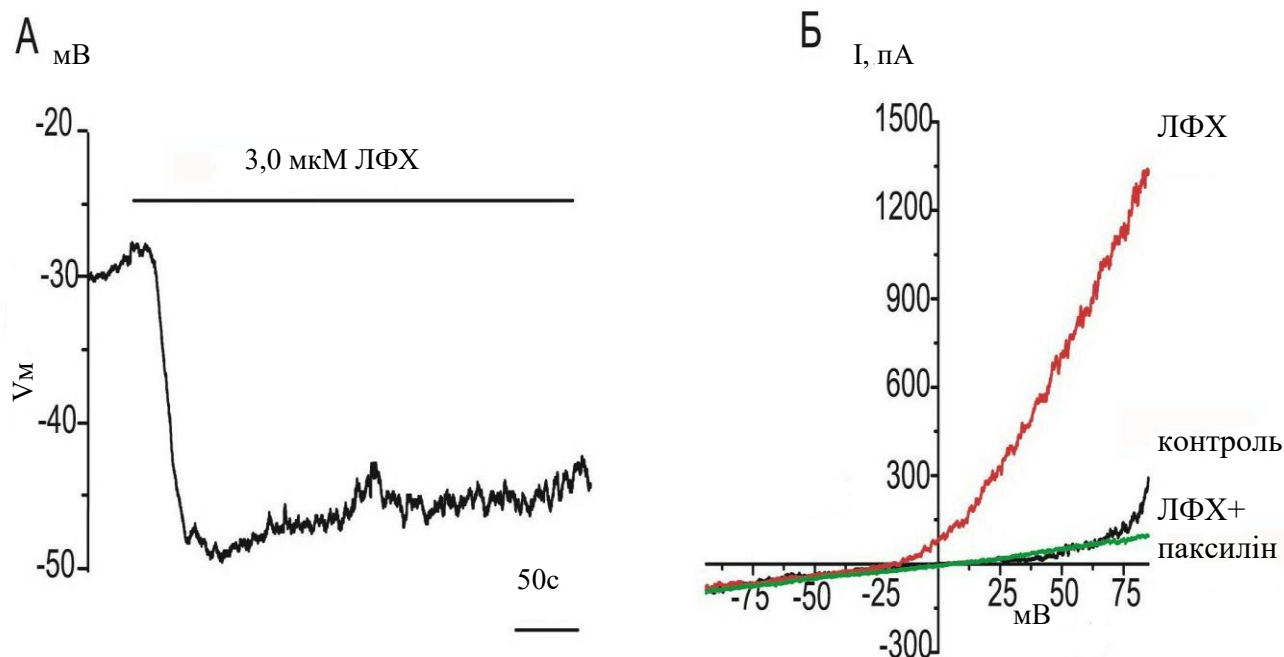
активувати ВКСа-канали. Мембранний холестерин є важливим регулятором активності іонних каналів, включаючи і ВКСа-канали [183]. Після одноденної преінкубації клітин у розчині, що містив 0,5 МЦД, ДГК не могла стимулювати активність ВКСа-каналів (рис.3.5.3. n=5). Ці експерименти дозволяють дійти висновку, що ДГК сприяє активності ВКСа-каналів через модифікацію ліпідних рафтів, а не через пряму взаємодію з білками каналу.

### **3.6. ПОДВІЙНИЙ ВПЛИВ ЛІЗОФОСФАТИДИЛІНОЗИТОЛУ ТА ЛІЗОФОСФАТИДИЛХОЛІНУ НА ЕЛЕКТРИЧНУ ВІДПОВІДЬ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН**

#### **3.6.1. Лізофосфатидилхолін викликає гіперполяризацію ендотеліальних клітин внаслідок активації ВКСа-каналів**

Було досліджено вплив ЛФХ на мембранний потенціал нестимульованих ЕК. Аплікація 3,0 мкМ ЛФХ викликала гіперполяризацію цих клітин від середнього значення мембранного потенціалу в умовах спокою  $-29,3 \pm 2,4$  мВ до значення  $-40,6 \pm 4,5$  мВ (n=9) (рис. 3.6.1. А). В режимі фіксації потенціалу, ЛФХ зумовлював активацію струму вхідного напрямку, який був чутливий до паксиліну (інгібітору ВКСа-каналів) (рис. 3.6.1. Б). Цей факт свідчив, що струм, який активувався ЛФХ, був ВКСа-струмом.

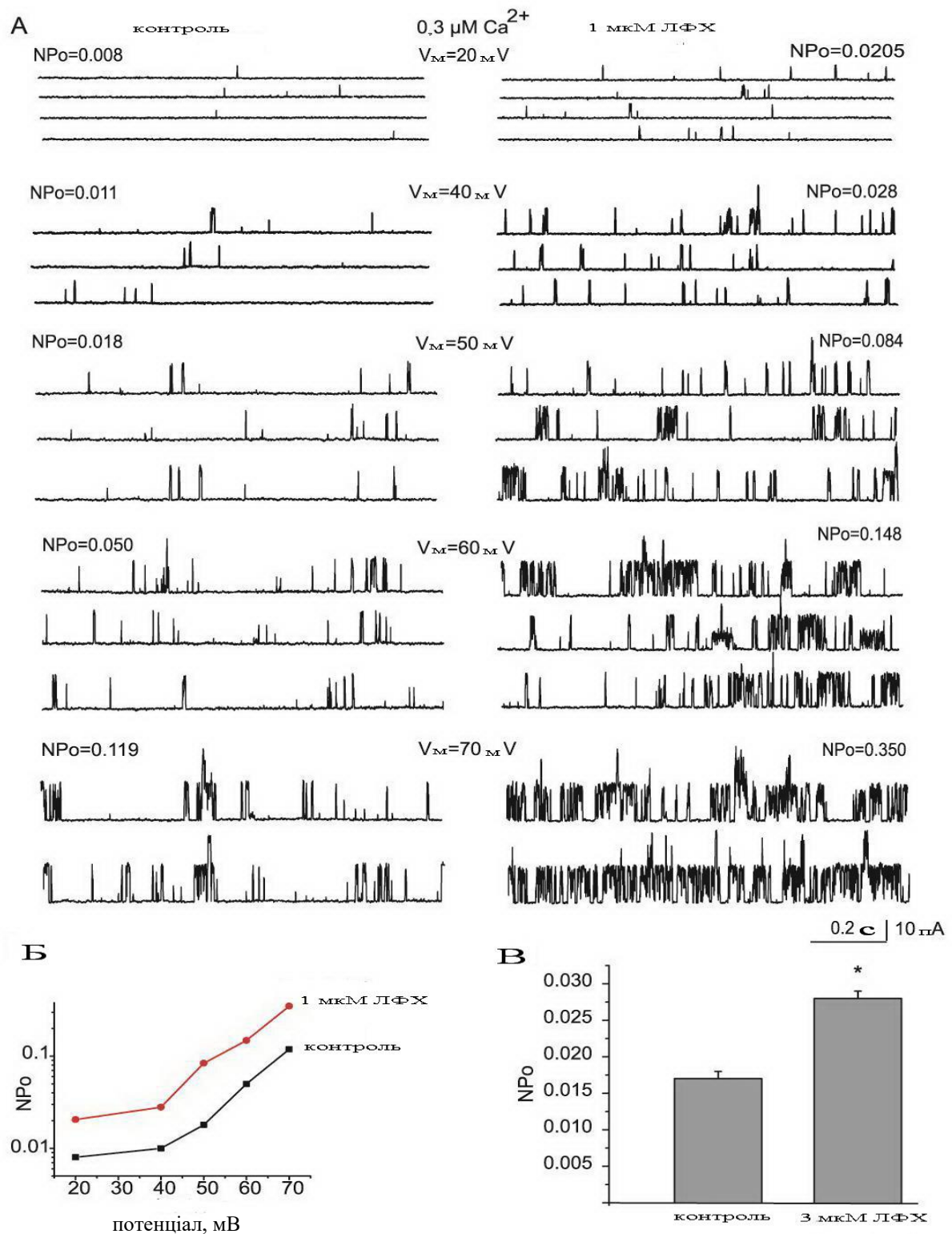
Щоб з'ясувати, чи вимагає підсилення струмів ВКСа-каналів під дією ЛФХ змін в цитозольній концентрації кальцію, активність поодиноких ВКСа-каналів була зареєстрована при фіксованій концентрації  $Ca^{2+}$ . В присутності 0,3 мкМ  $Ca^{2+}$  в розчині, ЛФХ, аплікований до внутрішньої поверхні ділянки петчу, активував поодинокі ВКСа-канали. Ступінь активації не відрізнявся в діапазоні значень потенціалів від 20 до 70 мВ (Рис.3.6.2. А та Б), вказуючи на



**Рис. 3.6.1.** Гіперполяризація ендотеліальних клітин лінії EA.hy926 і активація ВКСа-каналів під впливом ЛФХ. **А** — Вплив 3,0 мкМ ЛФХ на мембранний потенціал ЕК. **Б** — Калієві струми в конфігурації «whole cell» у відповідь на рампові зміни напруги від -80 до +80 мВ за відсутності (контроль) і наявності 3,0 мкМ ЛФХ і комбінованої присутності 3,0 мкМ ЛФХ і 1,0 мкМ паксиліну.

те, що активація відбувається потенціалнезалежним чином. Так, при фіксованому потенціалі -40 мВ і концентрації вільного  $\text{Ca}^{2+}$  0,3 мкМ додавання 3,0 мкМ ЛФХ призводило до зростання середнього значення  $\text{IPo}$  від  $0,017 \pm 0,001$  до  $0,028 \pm 0,001$  ( $n=9$ ) (Рис. 3.6.2. В).

### 3.6.2. ЛФІ та ЛФХ оборотно інгібують гіперполяризацію ендотеліальних клітин викликану дією гістаміну



**Рис.3.6.3.** А — записи активності поодиноких ВКСа-каналів в конфігурації «outside-out», при різних показниках напруги і фіксованому  $\text{Ca}^{2+}$  в 300 нМ до (ліворуч) і після (праворуч) застосування 1,0 мкМ ЛФХ. Б — Графічне

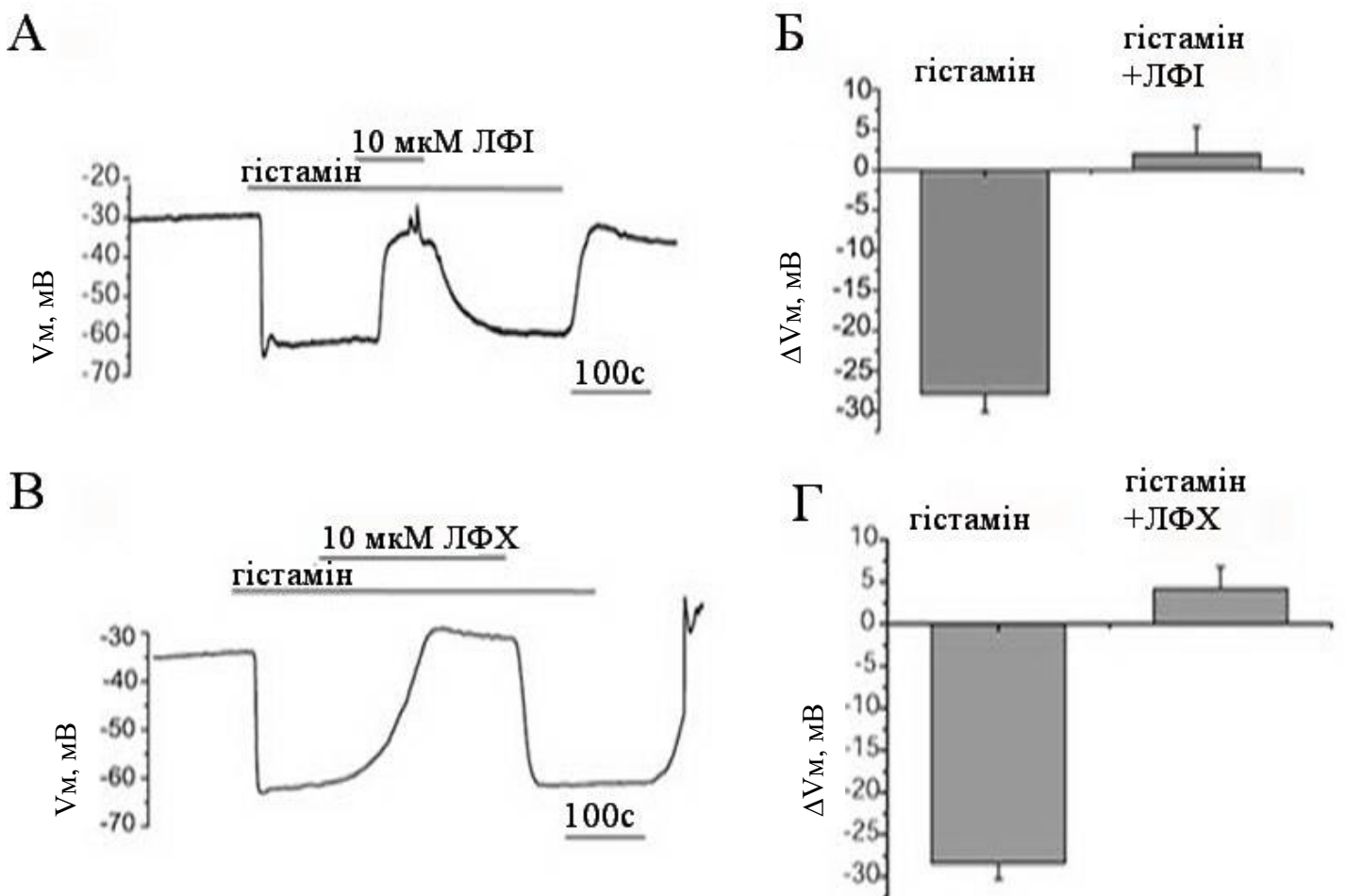
представлення відповідних значень  $NP_o$  при різних напругах в контрольних умовах (контроль) і після застосування 1,0 мкМ ЛФХ. **В** — Середні значення  $NP_o$  активності ВКСа-каналів в конфігурації «outside-out» при потенціалі 40 мВ і фіксованому  $Ca^{2+}$  в 300 нМ до і після додавання 3,0 мкМ ЛФХ ( $n = 9$ ) до зовнішньоклітинного розчину.

На клітинах EA.hy926 спершу тестували чутливість стійкої гіперполяризації, викликаній аплікацією 100 мкМ гістаміну, до ЛФІ та ЛФХ. Коли 10 мкМ ЛФІ було застосовано під час плато-фази гіперполяризації ( $27,8 \pm 2,2$  мВ,  $n=5$ ), остання повністю усувалась ( $n=5$ ) (Рис. 3.6.3. А та Б). Гіперполяризація відновилась при відмиванні ЛФІ. Гіперполяризація відновлювалася при відмиванні ЛФІ. Подібно до ЛФІ, ЛФХ (10 мкМ), застосований на плато-фазі гіперполяризації, повністю усував гіперполяризаційну відповідь протягом 3 хв (Рис. 3.6.3. В та Г). Гіперполяризація не зберігалася в умовах постійної присутності ЛФХ та гістаміну, але відновлювалася при відмиванні ЛФХ. Ці факти вказують на те, що і ЛФІ і ЛФХ діють як потужні інгібітори гістамініндукованої гіперполяризації ЕК; вони узгоджуються з результатами попередніх досліджень щодо зменшення пригнічення рівня внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$  [160] та розвитку ендотеліязалежної гіперполяризації [164] на ацетилхолін, викликане ЛФХ та ЛФІ.

### **3.6.3. ЛФІ та ЛФХ пригнічують прямий і зворотній режим $Na^+/Ca^{2+}$ - обмінника незалежно від GPCR та супероксид аніонів**

Так як  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінник при реверсному режимі робить вклад в тривалу ендотеліальну гіперполяризацію на ацетилхолін завдяки прямому електрогенному ефекту, чи непрямо, через стимулювання ВКСа-каналів після входу  $Ca^{2+}$  [133], надалі досліджувалось, чи пояснюється інгібіторний ефект ЛФІ та ЛФХ на гіперполяризацію інгібуванням  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінника. Коли провідність калію пригнічували розчином з  $Cs^+$ , який містив низьку концентрацію  $Ca^{2+}$  (100 нМ) та 10 мМ  $Na^+$ , рампові зміни напруги від -100 до 85 мВ викликали струм

зовнішнього випрямлення з реверсним потенціалом, близьким до того, що розрахований для  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника при наших експериментальних умовах (-55 мВ). Цей струм викликався гістаміном і далі посилювався переключенням на безнатрієвий розчин (рис.3.6.4. А та Б) — маневр, який широко використовується для запуску входу  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник. Ці спостереження, так само як чутливість струму до бепридилу, інгібітору  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника [184] (див нижче та [176]), узгоджуються зі зростанням активності  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника при реверсному режимі при цих експериментальних умовах. Подальше застосування ЛФІ (1 — 10 мкМ) в безнатрієвому розчині концентраційнозалежно пригнічувало струми (рис. 3.6.4. А-В). Струм надалі інгібувався 100 мкМ бепридилу (рис. 3.6.4. А та Б).



**Рис.3.6.3** ЛФІ та ЛФХ пригнічують гіперполяризацію клітин EA.hy926 на гістамін. А — запис мембранного потенціалу показує, що 10 мкМ ЛФХ інгібує

*тривалу гіперполяризацію у відповідь на 100 мкМ гістаміну; Б — статистичне представлення, що показує амплітуду відповідей мембранного потенціалу на гістамін до і після додавання 10 мкМ ЛФХ. В — запис мембранного потенціалу, що показує вплив ЛФІ на гіперполяризацію, викликану дією 100 мкМ гістаміну; Г — середні значення амплітуди змін мембранного потенціалу при дії гістаміну до і після додавання 10 мкМ ЛФІ.*

Вищі концентрації ЛФІ не досліджувались через збільшення ризику формування міцел при концентрації вище за 10 мкМ [185], і  $IC_{50}$  було неможливо визначити.

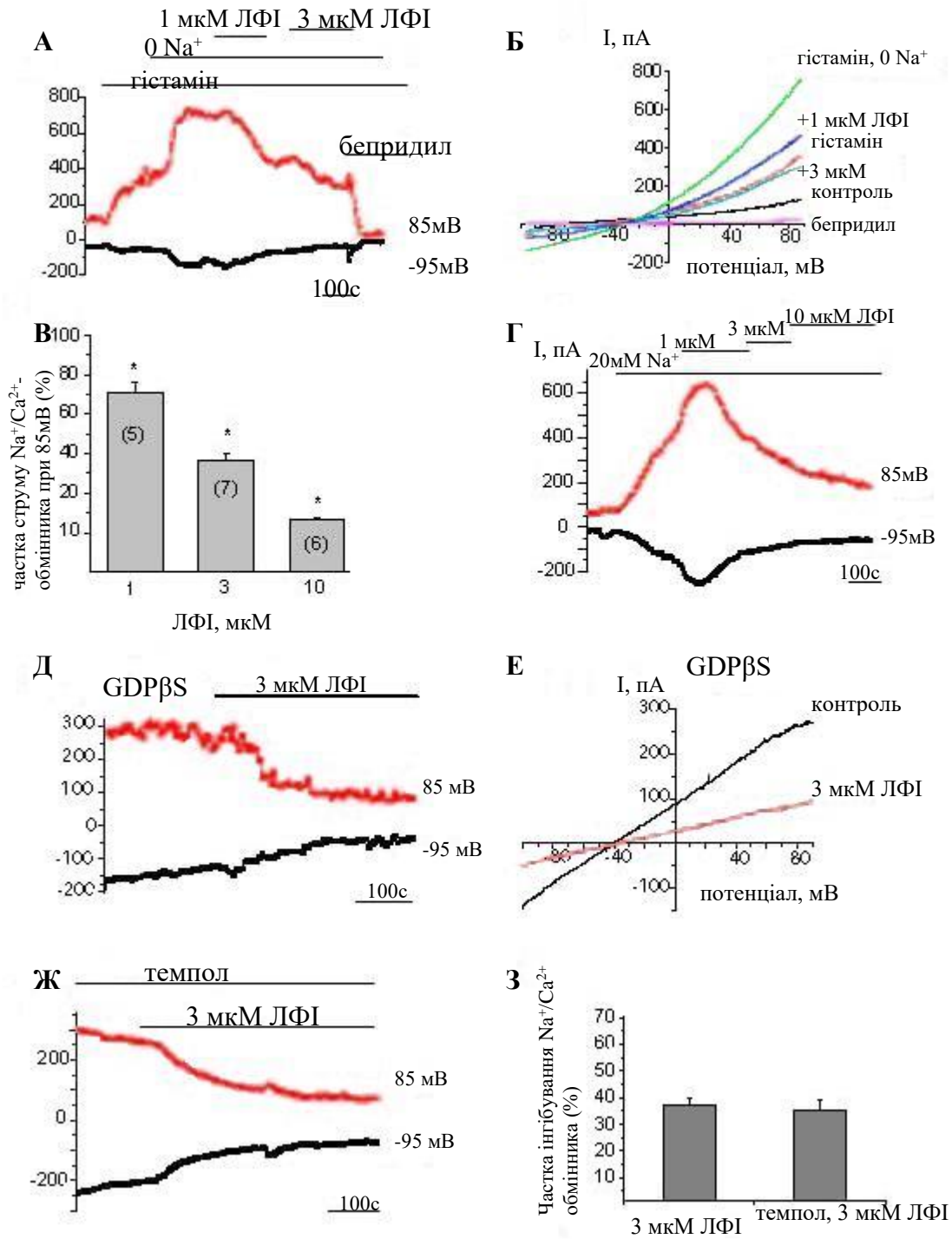
Щоб з'ясувати ймовірну роль депозалежного входу  $Ca^{2+}$  (SOCE) активованого після часткового спустошення депо кальцію гістаміном в інгібуючому ефекті ЛФІ, вхід  $Ca^{2+}$ , залежний від  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінника, був престаимульований тільки зменшенням концентрації  $Na^+$  в зовнішньому розчині (20 мМ), без попередньої обробки гістаміном. Ця процедура призвела до виникнення струмів спрямованих назовні, які блокувались подальшим застосуванням ЛФІ (рис. 3.6.4. Д).

Також досліджувався ефект ЛФІ на базальні струми  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінника, тобто без попереднього додавання гістаміну та розчину з низьким вмістом натрію.

За цих умов, ЛФІ інгібував струм спрямований як назовні (обернений режим), так і всередину (прямий режим) при позитивних та негативних потенціалах відповідно, вказуючи що ефект ЛФІ на  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінник не залежить від режиму. ЛФІ пригнічував струм  $Na^+/Ca^{2+}$  обмінника коли піпеточний розчин був доповнений інгібітором G-білку —  $GDP\beta S$  (0,5 мкМ) (рис.3.6.4. Д та Е), що вказує на те, що GPCR не задіяний в інгібіторному ефекті.

Раніше було показано, що супероксид аніони опосередковують інгібіторний ефект деяких ЛФ холінів на ендотелійзалежну релаксацію [163, 166], і. щоб дослідити роль супероксиду на ефект ЛФІ, надалі було досліджено вплив міметіку супероксид-дисмутази темполу на ефект ЛФІ на струм  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінника. Преінкубація з темполом (10 мкМ) була неспроможна

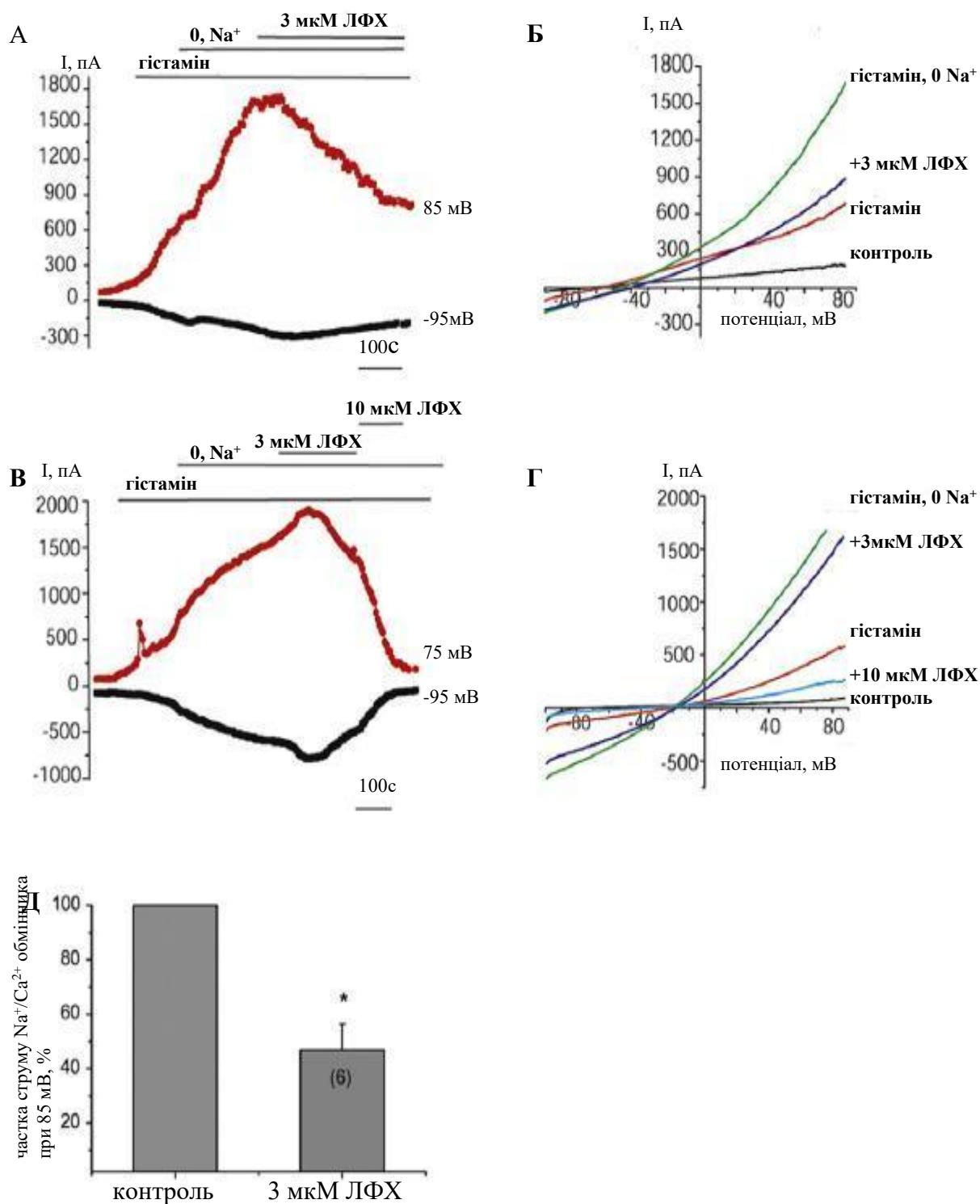




**Рис. 3.6.4.** ЛФІ інгібує як прямий, так і зворотний режими струмів Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обмінника незалежно від GPCR і супероксидних аніонів. А — Часовий хід інгібування струму Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обмінника на 1,0 і 3,0 мкМ ЛФІ. Струми Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обмінника були попередньо стимульовані гістаміном (100 мкМ) і

заміщенням  $\text{Na}^+$  в зовнішньо клітинному розчині на NMDG. Інгібітор  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника бепридил (100 мкМ) вводили в кінці запису. **Б** — Відповідні струми  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника (зображених на **А**), викликані рампами напруги, показані до (контроль), в присутності гістаміну (гістамін) і наступного заміщення  $\text{Na}^+$  на NMDG до (гістамін, 0  $\text{Na}^+$ ) і після застосування 1,0 мкМ ЛФІ (+1 мкМ ЛФІ), 3,0 мкМ ЛФІ (+3 мкМ ЛФІ) і бепридилу (100 мкМ). **В** — Графічне представлення залежного від концентрації ефекту ЛФІ на амплітуді струму  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, записаного при +85 мВ. **Г** — часова залежність ефекту 1,0, 3,0 і 10 мкМ ЛФІ на амплітуду струмів  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, попередньо стимульованих зниженням концентрації  $\text{Na}^+$  в розчині ванночки до 20 мМ при зазначених напругах, без попереднього впливу гістаміну. **Д** — часова залежність ефекту 3,0 мкМ ЛФІ на амплітуду струмів  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, записаних при -95 мВ (в прямому режимі) і 85 мВ (реверсний режим) в присутності  $\text{GDP}\beta\text{S}$  (0,5 мМ). **Е** — Відповідні струми  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, часовий перебіг яких представлений на **Д**. **Ж** — типова часова залежність протікання струму  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника до і після додавання 3 мкМ ЛФІ в присутності 10 мкМ темполу. **З** — пригнічення амплітуди струму  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника після додавання 3 мкМ ЛФІ у відсутності і присутності темполу (10 мкМ). Амплітуди струму були розраховані при 85 мВ.

попередити інгібування струму  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, спричинене 3 мкМ ЛФІ (рис.3.6.4. Ж). В присутності 10 мкМ темполу, 3 мкМ ЛФІ інгібував струм  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника в прямому (при -95 мВ) та зворотньому (при 85 мВ) режимах до  $29,8 \pm 1,2\%$  та  $35,4 \pm 3,8\%$  ( $n=4$ ) відповідно, від початкових значень. Ступінь інгібування обох режимів  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника не була достовірно різною ( $p=0,12$ ). Ніякої достовірної різниці не було отримано в ступені інгібування струму  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, спричиненої 3,0 мкМ ЛФІ в присутності чи відсутності темполу ( $n=4$ ,  $p>0,1$ , (рис.3.6.4. З).



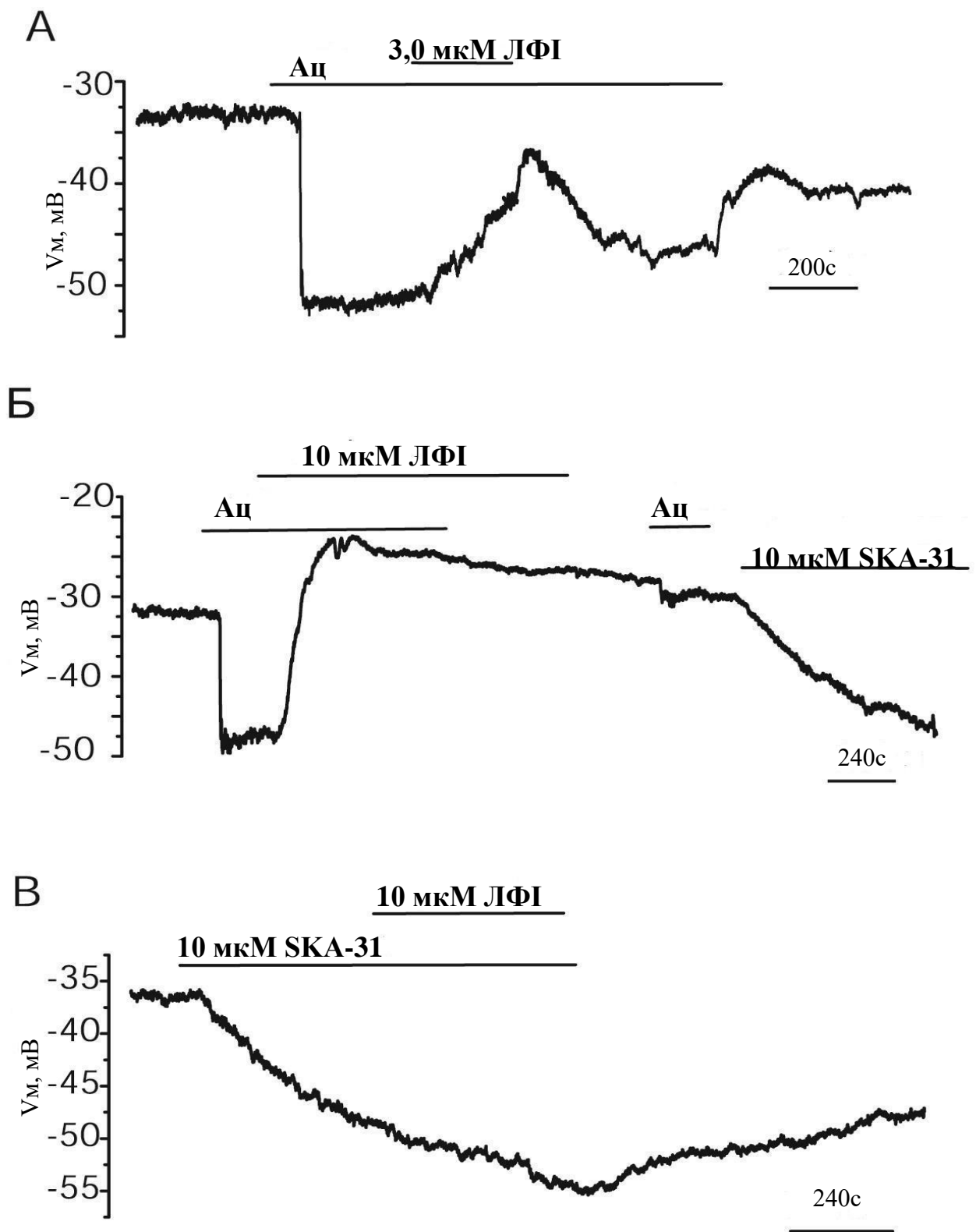
**Рис.3.6.5.** ЛФХ інгібує струми Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обмінника. А — Репрезентативний (n = 6) часовий хід амплітуд струму Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обмінника попередньо стимульованого гістаміном і наступним переключенням на безнатрієвий розчин, з наступним

введенням 3,0 мкМ ЛФХ під час рампових змін напруги при вказаних потенціалах. **Б** — Відповідні струми  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, викликані рампами напруги в контрольних умовах (контроль), в присутності 100 мкМ гістаміну (гістамін) і наступної заміни  $\text{Na}^+$  до (без гістаміну і  $\text{Na}^+$ ) і після введення 3,0 мкМ ЛФХ. **В** — Репрезентативний часовий хід амплітуд струму  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника показує прискорення інгібуванням струму  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника на 10 мкМ ЛФХ. **Г** — Відповідні записи струму у відповідь на рампові зміни напруги. **Д** — Статистичне представлення інгібуючого ефекту 3,0 мкМ ЛФХ на амплітуду струму  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, записаного при 85 мВ під час рампових змін напруги.

Надалі було досліджено ефект ЛФХ на струм  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника. Коли реверсний режим  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника був викликаний експозицією гістаміну в безнатрієвому розчині, застосування 3,0 мкМ ЛФХ призвело до градуального, залежного від часу, пригнічення струму до  $46,8 \pm 9,7\%$  ( $n=6$ ) від початкової амплітуди, виміряної при 85 мВ (рис.3.6.5. А, Б та Д). Зростання концентрації ЛФХ до 10 мкМ ще сильніше пригнічувало струм (рис.3.6.5. В та Г).

### **3.6.4. В ізольованій мишачій аорті, ЛФІ пригнічує ендотеліальну гіперполяризацію на ацетилхолін, але не на SKA-3**

Надалі було досліджено, чи модифікує ЛФІ гіперполяризацію ЕК на ацетилхолін в судинній тканині. В ізольованих мишачих аортах, ацетилхолін (2,0 мкМ) викликає стійку гіперполяризацію ЕК, яка інгібувалась при додаванні у розчин ЛФІ (3,0 мкМ) під час фази плато (рис. 3.6.6. А). Вплив 10 мкМ ЛФІ, однак, був слабо оборотним, ймовірно, через накопичення ЛФІ в тканині, і ацетилхолін був не спроможним викликати гіперполяризуючі відповіді незабаром після відмивання ЛФІ (рис. 3.6.6. Б). На противагу цьому, гіперполяризація у відповідь на додавання SKA-31 (активатора  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних  $\text{K}^+$  каналів середньої (IKCa) і малої (SKCa) провідності), не змінювалась попередньою експозицією з



*Рис. 3.6.6. В ізольованій м'язовій аорті, ЛФІ пригнічує ендотеліальну гіперполяризацію на ацетилхолін, але не на SKA-31*

*А.— ефект 3,0 мкМ ЛФІ на ендотеліальну гіперполяризацію у відповідь на 2,0 мкМ ацетилхоліну; Б.— ефект 10 мкМ ЛФІ на ендотеліальну гіперполяризацію до двох послідовних застосувань 2 мкМ Ац. Гіперполяризація на SKA-31 (10 мкМ) не вплинув на попередню експозицію з ЛФІ. В.— Репрезентативний запис мембранного потенціалу від ендотелію аорти мишей демонструє нездатність ЛФІ (10 мкМ) інгібувати гіперполяризацію, викликану до 10 мкМ SKA-31.*

10 мкМ ЛФІ (**рис. 3.6.6. Б**) або додаванням ЛФІ у розчин під час гіперполяризації викликаної SKA-31 (**рис. 3.6.6. В**).

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

*Вплив омега-3 ПНЖК на набухання субсарколемальної та інтерфібрилярної фракцій мітохондрій міокарда*

Для визначення чутливості мітохондрій до  $\text{Ca}^{2+}$  навантаження, використовують реєстрацію змін світлорозсіювання мітохондріальної суспензії, яке виявляє зміни об'єму матриксу мітохондрій.  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане мітохондріальне набухання часто використовується в якості маркера відкриття МППП. У даній роботі ми досліджували вплив дієти збагаченої омега-3 ПНЖК-вмісним препаратом «Епадол» на набухання мітохондрій СС та ІФ фракцій як у без кальцієвому, так і в  $\text{Ca}^{2+}$ -вмісному розчинах. Раніше описано, що додавання до раціону омега-3 ПНЖК в кількості 2 — 8 г на день є корисними при лікуванні гіпертригліцеридемії та станів, що супроводжуються хронічними запальними процесами [188]. За даними виробника, «Епадол» рекомендується в дозі 4 — 6 г на добу. Ми використовували дієтичні омега-3 ПНЖК, щоб виявити можливі відмінності в чутливості до  $\text{Ca}^{2+}$  двох фракцій мітохондрій. Раніше було показано, що споживання омега-3 ПНЖК в меншому дозуванні протягом двох місяців, модулює активність NOS і експресію конексину-43 у спонтанногіпертензивних щурів [189].

В контрольній групі не спостерігалось різниці в набуханні двох фракцій мітохондрій, вказуючи на те, що ІФ та СС мітохондрії не відрізняються в чутливості до  $\text{Ca}^{2+}$ . У цій групі, СС та ІФ мітохондрії продемонстрували поступове набухання з плином часу у безкальцієвому розчині. Так як тривала інкубація в безкальцієвому середовищі під час виділення мітохондрій призводить до втрати  $\text{K}^+$  з матриксу, можна припустити, що набухання мітохондрій в безкальцієвому розчині пояснюється поглинанням іонів  $\text{K}^+$  з середовища інкубації, пов'язане з рухом всередину води через описані в літературі механізми [190, 191]. Отже, наші дані можуть свідчити про те, що у контрольній групі щурів, рівень поглинання  $\text{K}^+$  у двох субпопуляціях мітохондрій міокарда істотно не відрізняється. Тим не менше, ми виявили, що в ІФ-фракції з експериментальної

групи зниження оптичної щільності в розчині без  $\text{Ca}^{2+}$  було значно менш вираженим порівняно з СС-фракцією. Очевидною причиною для мітохондріального набухання в розчині без  $\text{Ca}^{2+}$  є транспорт  $\text{K}^+$ .

Оскільки іони  $\text{Ca}^{2+}$  потрібні для активності мітоВКСа-каналів, малоймовірно, що ці канали опосередковують вхід  $\text{K}^+$ , відповідальний за набухання мітохондрій у безкальцієвому розчині. Відкриття мітоКАТР-каналів залучене в механізм ішемічного прекодиціонування [191, 192], хоча існування цього каналу все ще обговорюється [193]. Примітно, що активатори чи блокатори мітоВКСа-каналів або не викликають у мітохондріях серця ніяких змін у світлорозсіюванні [194] або відносно невеликі (до 5%) [193], вказуючи на те, що зменшення оптичної щільності в безкальцієвому розчині в ІФ-фракції з експериментальної групи навряд чи пов'язано з пригніченням мітоКАТР-каналів. Наші власні неопубліковані спостереження вказують на те, що активатори КАТР каналів з різними хімічними структурами (діазоксид і флокалін, фторвмісне похідне пінацидилу) по різному впливають на набухання мітохондрій, підтверджуючи попередні повідомлення про те, що більшість модуляторів мітоКАТР-каналів має ряд неспецифічних ефектів на мітохондріальні механізми перенесення іонів [193, 194], через що результати важко інтерпретувати. Іншим механізмом, відповідальним за набухання мітохондрій, є пасивна проникність протонів ( $\text{H}^+$ -витік) і катіонів, обумовлена негативним потенціалом мітохондріальної мембрани. Незважаючи на те, що ми безпосередньо не вимірювали мітохондріальний мембранний потенціал в цьому дослідженні, цілком ймовірно, що знижене розсіювання світла ІФ-фракцією з експериментальної групи в безкальцієвому розчині, може бути наслідком зменшення входу  $\text{K}^+$ , ймовірно через деполяризацію мембрани. Наше спостереження, що застосування омега-3 ПНЖК суттєво пригнічує набухання ІФ-, але не СС-фракції в безкальцієвому розчині, може вказувати на різні ефекти цього впливу на потенціал мітохондріальної мембрани в двох мітохондріальних фракціях, виділяючи можливі внутрішні відмінності у механізмах електрогенезу у двох мітохондріальних фракціях. Відомо, що невелика мітохондріальна



деполяризація сприяє кардіопротекції, — явище, яке пояснюється суворою залежністю поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями від потенціалу мембрани. Справді, наше спостереження, що ІФ-фракція виявляє вищу стійкість до  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого пошкодження після застосування омега-3 ПНЖК призводить до припущення, що ІФ мітохондрії цієї групи швидше за все деполяризовані.

Відмінності в чутливості до захисту, викликаного дієтичними омега-3 ПНЖК, можуть вказувати на те, що механізми, задіяні в омега-3 ПНЖК-індукованому захисті від  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого відкриття МППП в ІФ і СС мітохондріях, відрізняються. Декілька механізмів можуть лежати в основі захисного ефекту дієтичних омега-3 ПНЖК від  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого відкриття МППП. Було висловлено припущення, що позитивний вплив дієти, багатой на омега-3 ПНЖК, опосередковується включенням ЕПК і ДГК в клітинні мембрани [100]. Повідомлялось, що споживання риб'ячого жиру (містить ДГК і ЕПК) протягом 8 тижнів затримує відкриття  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованої МППП як у СС, так і в ІФ мітохондріях [101]. Таке споживання риб'ячого жиру призводило до збільшення вмісту ЕПК і ДГК і зменшення АК в серцевих мітохондріальних фосфоліпідах. Хоча АК було ідентифіковано як індуктор МППП [195], добавки з АК *in vivo* затримують відкриття МППП [103], що робить малоімовірним, що модуляція вільної АК повністю пояснює сприятливий вплив омега-3 ПНЖК на відкриття МППП. Крім того, незважаючи на збільшення ДГК і зменшення вмісту АК у фосфоліпідах серця, не спостерігали змін у відкритті МППП у щурів з серцевою недостатністю, тобто малоімовірно, що причина затримки відкриття МППП у контрольних щурів — це зміни у складі фосфоліпідів.

Ці ж автори вивчали можливі відмінності між окремими ефектами ЕПК і ДГК на нормальний і гіпертрофований міокард [196]. Було встановлено, що застосування тільки ДГК ефективно збільшує як ДГК, так і ЕПК у фосфоліпідах серцевих мітохондрій. Ці зміни супроводжувалися затримкою відкриття МППП як у нормальному, так і при гіпертрофованому міокарді [196]. Отже, зміна фосфоліпідного складу мітохондрій серця при різних патологічних станах може [196] або не може [101] позитивно корелювати з відкриттям МППП. Відповідь на

очевидний парадокс може полягати в морфологічній та функціональній гетерогенності мітохондрій, їх різній чутливості до  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого відкриття МППП і, можливо, фосфоліпідній композиції після різних способів застосування дієтичних ПНЖК.

Нещодавно було повідомлено, що ІФ, але не СС мітохондрії серця, ставали більш вразливими до  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого відкриття МППП при старінні [197]. Враховуючи більшу чисельність ІФ мітохондрій (80%) у порівнянні з СС (20%), наш висновок, що захисний ефект дієтичних омега-3 ПНЖК від  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого пошкодження більш виражений для ІФ мітохондрій, вказує на те, що омега-3 ПНЖК може бути особливо корисним у літніх людей. На підтвердження цього було показано, що дієта, багата омега-3 ПНЖК, змінює пов'язаний з віком мембранний омега-3/омега-6 ПНЖК дисбаланс, підвищуючи стійкість до ішемії та реперфузії [108].

Показано, що хоча в контрольних умовах ІФ і СС фракції мітохондрій мають схожу чутливість до  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого відкриття МППП, захисний ефект омега-3 ПНЖК помітно більш виражений для ІФ, ніж для СС фракції мітохондрій. Різна чутливість до відкриття МППП після застосування омега-3 ПНЖК, яке спостерігається в цьому дослідженні, може мати функціональне застосування. Хоча ІФ мітохондрії можуть відігравати роль у передачі сигналу з позаклітинного простору, СС мітохондрії більш підходять для контролю життєздатності клітин і захисту від надмірного навантаження  $\text{Ca}^{2+}$ . Різні функціональні навантаження двох мітохондріальних фракцій, ймовірно, забезпечуються специфічними механізмами сигналізації. Необхідні подальші дослідження для розуміння більш фундаментальних механізмів кардіопротекторної сигналізації, опосередкованих мітохондріями за контрольних і патологічних умов.

*Вплив омега-3 поліненасичених жирних кислот на показники функціонування мітохондрій міокарда при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця*

Новизною нашої роботи є те, що було порівняно ступінь пошкодження двох фракцій мітохондрій при дії ізопротеренолу, а також виявлено рівень захисного впливу омега-3 ПНЖК. Варто зазначити, що ці кислоти однаково вбудовуються в мембрану кожної субпопуляції [209], тобто виявлена нами різниця в ефекті зумовлена властивостями самих фракцій мітохондрій. Так, показано, що ССМ мають вищий вміст кардіоліпіну, а ІФМ — вищу експресію ключових компонентів пори, зокрема, потенціалзалежного аніонного каналу і циклофіліну D, крім того, вищий вміст цитохрому с [24].

В роботі Izem-Meziane M et al показано, що мітохондрії серця на ізопротеренолове пошкодження реагують набуханням [73], проте не було порівняно дві фракції мітохондрій між собою.

Таким чином, результати роботи поглиблюють знання про механізми порушення функціонування серця при ізопротереноліндукованому пошкодженні та підтверджують порушення дихання ізольованих мітохондрій за умов окиснення сукцинату. Показано, що застосування омега-3 ПНЖК за цих умов підвищує ефективність дихання мітохондрій та запобігає набуханню мітохондрій серця.

Отже, омега-3 ПНЖК мають значний потенціал у попереджанні розвитку дисфункцій мітохондрій і можуть бути рекомендовані як компонент лікарської терапії хворих, які перенесли інфаркт міокарда

Хоч і високий мембранний потенціал мітохондрій більш вигідний щодо попередження відкривання МППП, але встановлено прямий зв'язок між рівнем мембранного потенціалу та продукцією АФК. І дійсно, ССМ, які мають вищий рівень продукції АФК, мають і вищий потенціал [24]. Омега-3 ПНЖК, в свою чергу, знижують мітохондріальний мембранний потенціал [210], що знову таки, можна трактувати двояко. З одного боку, зменшується рівень утворення АФК, з іншого, зменшується вхід кальцію в мітохондрії.

Суперечливі літературні дані щодо порівняння чутливості двох фракцій мітохондрій до підвищеного вмісту кальцію. Palmer та співавт. [53], вважають, що ІФМ мають більшу стійкість до навантаження кальцієм, а за даними Adhihetty та співавт. [24], ССМ більш стійкі. Згідно з результатами нашої роботи, ці дві

фракції не відрізняються за чутливістю до високих концентрацій кальцію. Омега-3 ПНЖК більш ефективно захищають фракцію ІФМ, що узгоджується з отриманими раніше даними про протекторний вплив знову таки на цю фракцію при ізопротереноловому пошкодженні міокарда [223].

Виявлений нами захисний ефект омега-3 ПНЖК при ізопротереноловому пошкодженні, що був у різному ступені виражений між фракціями, може бути пояснено станом про- та антиоксидантної системи. Відомо, що дві фракції мітохондрій мають різний рівень утворення АФК — ССМ в 2,7 раза більше виробляють АФК, ніж ІФМ [24]. За патологічних умов у ССМ підвищується рівень утворення  $H_2O_2$ , в той час як в ІФМ він не змінюється [224]. З іншого боку, є дані, що рівень експресії антиоксидантного ферменту Мп-СОД не відрізняється між субпопуляціями [24].

Таким чином, застосування омега-3 ПНЖК запобігає набуханню мітохондрій в серці за умов ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда, особливо фракції ІФМ.

#### *Дихання мітохондрій при ізопротереноловому пошкодженні міокарда за умов впливу омега-3 ПНЖК*

Метою цього дослідження було дослідити можливу захисну дію омега-3 ПНЖК на показники дихання мітохондрій та відкривання МППП після ін'єкцій ізопротеренолу. Встановлено, що за умов ізопротеренолового пошкодження, погіршуються показники дихання мітохондрій при окисненні сукцинату — знижується швидкість фосфорилування в стані 3 та дихального контролю та, можливо, індукується відкривання МППП. Це загалом узгоджується з даними літератури. Було показано, що ін'єкції ізопротеренолу знижують швидкість фосфорилування в стані 3 та дихального контролю [72, 83]. Але як показано Sivakumar та співавт. [72] зміна показників дихання відмічалася при окисненні сукцинату, тоді як у праці Wang та співавт. [79] — тільки при окисненні глутамату та малату.

Новизною цієї роботи є те, що було виявлено захисний вплив омега-3 ПНЖК при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця — при реєстрації дихання встановлено, що швидкість дихання в стані 3, дихальний контроль та ефективність фосфорилування достовірно відновлювались у щурів з ізопротереноловим пошкодженням при застосуванні омега-3 ПНЖК. Підтверджено, що ін'єкції ізопротеренолу змінюють показники дихання мітохондрій при окисненні сукцинату; швидкість дихання в стані 4 в наших дослідках достовірно не змінилася. Також відновлювалась здатність мітохондрій реагувати на додавання іонів кальцію при реєстрації світлопоглинання суспензії у групі омега-3 ПНЖК.

Дані літературних джерел свідчать, що порушення мітохондріального метаболізму відіграє важливу роль при серцевій недостатності [72]. Попередження відкривання МППП і покращення показників дихання за умов застосування омега-3 ПНЖК запобігає пошкодженню міокарда навіть при підвищенні вмісту катехоламінів.

Відомо що дія ізопротеренолу викликає оксидативний стрес [211, 212,], а застосування антиоксидантів попереджає ізопротеренолове пошкодження [79]. Водночас відомо, що вільні радикали полегшують відкривання пори при дії кальцію [213] та, можливо, самі індукують його [214]. Тобто пошкодження ізопротеренолом може бути зумовлене саме оксидативним стресом. Хоча вважається, що омега-3 ПНЖК чутливі до перекисного окиснення ліпідів, споживання їх може обмежувати оксидативний стрес за допомогою посилення антиоксидантного захисту, підвищуючи вміст СОД, зокрема мітохондріальної [215], та гемоксигенази-1 [216]. Також є дані, що омега-3 ПНЖК значно знижують вміст малонового діальдегіду — маркера перекисного окиснення ліпідів [217], наприклад, у тканинах серця [218].

Серед можливих механізмів негативної дії ізопротеренолу на мітохондрії може бути також те, що катехоламіни спричиняють вивільнення вільних жирних кислот, які в свою чергу діють як роз'єднувачі окисного фосфорилування та індукують відкривання пори, знижуючи мембранний потенціал нижче від порогового рівня [219], чи прямо взаємодіючи з компонентами пори, зокрема з

аденіннуклеотидтрансферазою [220]. Водночас омега-3 ПНЖК знижують вміст ЖК [218]. Тим не менш, чи відрізняються в чутливості дві фракції мітохондрій до індукції мітохондріальної пори при їх дії, даних нема.

Регуляція функціонування мітохондрій відбувається відповідно до енергетичних потреб клітини через сигнальні шляхи з залученням таких вторинних месенджерів, як цАМФ, кальцій тощо [37]. Показано, що омега-3 ПНЖК знижують також вміст мітохондріального кальцію [222], в той час як ізопроterenол підвищує внутрішньоклітинну його концентрацію [221]. Хоча кальцій за фізіологічних умов бере участь у регуляції мітохондріального метаболізму, зокрема, активує мітохондріальні ферменти (піруват,  $\alpha$ -кетоглутарат та ізоцитрат дегідрогенази), високі концентрації кальцію мають негативні наслідки, зокрема, індукують відкриття МП. Наші попередні дослідження [223] та дані інших авторів вказують, що застосування омега-3 ПНЖК зменшує кальційіндуковане відкриття МППП [103]. Усе зазначене може свідчити, що така захисна дія омега-3 ПНЖК опосередковується, принаймні частково, через мітохондріальні механізми.

#### *Залучення ВКСa-каналів в ефектах омега-3 ПНЖК на параметри дихання мітохондрій міокарда при високих концентраціях кальцію*

В розділі 3.1 було показано, що дієта з додаванням омега-3 ПНЖК захищає мітохондрії від  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого набухання [223], що свідчить про здатність жирних кислот пригнічувати чутливість МППП до відкриття. Оскільки відомо, що активація калієвих каналів внутрішньої мітохондріальної мембрани має кардіопротекторний вплив [5, 91], в цій роботі ми досліджували можливе залучення мітохондріальних ВКСa-каналів в модуляцію мітохондріального дихання ДГК. Літературні дані щодо впливу омега-3 ПНЖК на дихання мітохондрій при  $\text{Ca}^{2+}$ -перенавантаженні відсутні. Також немає літературних даних стосовно ролі мітохондріальних ВКСa-каналів у регуляції дихання мітохондрій при  $\text{Ca}^{2+}$ -перенавантаженні.

Нами показано, що ВКСа-канали є на внутрішній мітохондріальній мембрані кардіальних клітин і додавання ДГК призводить до збільшення їх активності. Якщо припущення, що захисна дія омега-3 ПНЖК на мітохондрії опосередкована дією ВКСа-каналів правильне, то при порівнянні параметрів дихання мітохондрій мають бути спільні риси у відповідях на омега-3 ПНЖК та  $\text{Ca}^{2+}$  та на дію активатору ВКСа-каналів NS1619 та  $\text{Ca}^{2+}$ .

Результати наших досліджень вказують на схожі риси впливу ДГК і NS1619 на параметри дихання мітохондрій міокарда. Так, за наявності обох агентів зростання швидкості дихання в МС-4 при додаванні  $\text{Ca}^{2+}$  повністю пригнічувалось. Також спостерігалось зменшення ДК у відповідь на додавання  $\text{Ca}^{2+}$  і воно було менш вираженим. Захисна дія ДГК і NS1619 на ДК за наявності 10 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  попереджувалась впливом паксиліну. Ці результати свідчать про залучення мітохондріальних ВКСа-каналів у регуляцію дихання мітохондрій в МС-4 та ДК при дії ДГК та NS1619.

Нами були також виявлені і деякі відмінності впливу ДГК та NS1619 на показники дихання мітохондрій. Так, тільки дія ДГК, але не NS1619, попереджувала зниження швидкості дихання в МС-3 при  $\text{Ca}^{2+}$ -перенавантаженні; при стані дихання МС-4 паксилін відміняв захисну дію NS1619, але не вплив ДГК. У разі введення паксиліну знижувалося відношення АДФ/О при дії NS1619, але не ДГК.

За даними деяких досліджень, NS1619 (30 мкМ) прискорює дихання мітохондрій в МС-2 та МС-4, причому блокатор ВКСа-каналів паксилін нівелював цей ефект [91]. За наявності пірувату як субстрат, NS1619 в концентрації 10, 20 і 30 мкМ не впливав на швидкість дихання в МС-3, але при концентрації 50 мкМ він значно його зменшував. За наявності сукцинату кожна з цих концентрацій NS1619 призводила до зменшення швидкості дихання в стані МС-3. Будь яка концентрація NS1619 дещо зменшувала ДК при дії всіх субстратів, вказуючи на м'яке роз'єднання. За наявності сукцинату, паксилін не блокував вплив NS1619 на швидкість дихання в МС-3. Тобто ці дані [91] демонструють, що відкривання ВКСа-каналів прискорює швидкість дихання в МС-2 та МС-4, але не

впливає на МС-3. Результати наших досліджень стосовно дії NS1619 на показники дихання мітохондрій узгоджуються з даними вказаних авторів.

Очевидно, що біоенергетика мітохондрій та гомеостаз кальцію складно взаємодіють [20]. Загальновідомо про кальцієву чутливість ключових ферментів циклу трикарбонових кислот. Відомо, що різке зростання вмісту мітохондріального  $\text{Ca}^{2+}$  спричинює серцеву дисфункцію через загибель кардіоміоцитів. Два ключові механізми, які призводять до пошкодження кардіоміоцитів при зростанні вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  — це генерація мітохондріями АФК та відкриття МППП [20]. Прискорення активності циклу трикарбонових кислот за наявності  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до посиленого витоку електронів і, таким чином, до формування АФК на електронотранспортному ланцюгу. Також мітохондріальне  $\text{Ca}^{2+}$ -перенавантаження пригнічує глутатіонредуктазу — антиоксидант матриксу.

У досліджах на мітохондріях мозку [47] було показано, що  $\text{Ca}^{2+}$  інгібує дихання вже у концентрації  $5 \cdot 10^{-7}$  М, причому часо- та концентраційнозалежно. В наших досліджах з сукцинатом як субстрат,  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрації 10 мкМ, знижував швидкість дихання мітохондрій серця в МС-3, прискорював в МС-4 та зменшував ДК. Літературні дані стосовно впливу омега-3 ПНЖК на дихання мітохондрій не однозначні. Так, повідомлялося, що дієта збагачена омега-3 ПНЖК не впливає на швидкість дихання мітохондрій в МС-3, МС-4, ДК та АДФ/О [25]. З іншого боку, показано, що годування щурів дієтою, збагаченою омега-3 ПНЖК, призводить до зменшення швидкості дихання в МС-3, МС-4, та ДК [107]. Причина цих неузгоджень не зрозуміла. Один з можливих механізмів дії омега-3 ПНЖК на функцію ВКСа-каналів — це пряма взаємодія молекул жирних кислот і білка каналу чи білків, асоційованих з ним. Альтернативно, жирні кислоти можуть змінювати ліпідні властивості мембрани, впливаючи на взаємодію білок — ліпід [117].

Хоча NS1619 вважається досить селективним активатором ВКСа-каналів, деякі дані літератури свідчать, що він викликає апоптоз. Вказані вище відмінності в дії NS1619 та ДГК можуть пояснюватись впливом як NS1619, так і ДГК на ВКСа-незалежні механізми. Проте пригнічення впливу ДГК на



показники дихання, зокрема відновлення швидкості дихання в МС-3, свідчить про залучення мітохондріальних ВКСа-каналів у модуляцію мітохондріального дихання омега-3 ПНЖК. Таким чином, показано залучення мітохондріальних ВКСа-каналів у реалізацію ефектів ДГК на процеси дихання мітохондрій. порівняно ступінь набухання двох фракції між собою.

*Стимулюючий ефект ДГК, представника ПНЖК класу омега, на активність ВКСа-каналів*

Результати наших досліджень демонструють, що при дії на ендотеліальні клітини ДГК стимулює паксилінчутливий калієвий струм вихідного випрямлення, що супроводжується гіперполяризацією клітин. Оскільки функція клітин ендотелію значною мірою контролюється входом  $\text{Ca}^{2+}$ , зумовленим мембранною гіперполяризацією, останній являє собою ключову сигнальну подію при ініціації ендотелійзалежній релаксації, незалежно від того, що її викликало — оксид азоту (NO) чи ендотелійзалежний фактор гіперполяризації (EDHF). Враховуючи, що ВКСа-канали широко поширені в клітинах гладенької мускулатури судин, активація ВКСа-каналів омега-3 ПНЖК та наступна гіперполяризація ендотелію можуть сприяти як ендотелійзалежній, так і ендотелійнезалежній релаксації. За різних патологічних станах, що супроводжуються дисфункцією ендотелію, таких як при гіпертензії [196] та діабеті [199], спостерігається деполяризація мембрани ендотелію через зниження активності  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТРази. Так як ВКСа-канали регулюються як  $\text{Ca}^{2+}$ , так і мембранним потенціалом, деполяризація ендотеліальних клітин на  $\sim 10$  мВ (що спостерігається при експериментальній гіпертензії та діабеті) може призвести до підвищеної чутливості до омега-3 ПНЖК за рахунок полегшеного відкриття ВКСа-каналів при деполяризації. Відповідно, пряме регулювання ВКСа-каналів омега-3 ПНЖК може представляти важливий механізм поліпшення функції ендотелію за патологічних умов.

Нещодавно було припущено, що омега-3 ПНЖК діють через GPR120 для опосередкування протизапальних та інсуліночутливих ефектів [136]. Щоб виявити можливу взаємодію ДГК з GPR120 або іншими G-білокзалежними рецепторами,

та розвитком GPR120 залежної стимуляції ВКСа-каналів, клітину діалізували з 1 мМ GDP $\beta$ S (інгібітор G-білка) [200]. За цих умов, додавання ДГК всеодно призводило до потенціації струму вихідного випрямлення у відповідь на рампові зміни напруги, що вказує на GPCR-незалежний механізм.

Як альтернативний підхід до вивчення ролі GPCR, досліджувався вплив ДГК на активність поодинокого каналу в режимі петч клампу «inside-out». У цій конфігурації цитозольні месенджери не контролюють функцію каналу. Узгоджуючись з GPCR-незалежним механізмом, в режимі петч клампу «inside-out» ДГК при застосуванні до внутрішньої поверхні мембрани, збільшує ймовірність відкриття ВКСа-каналів, що вказує на те, внутрішньоклітинні месенджери не є необхідними для потенціюючого впливу ДГК на ВКСа-канали. Важливо, що при збільшенні ймовірності відкриття каналу, амплітуда відповіді каналу залишалась без змін, що вказує на те, що ДГК змінює функцію ВКСа-каналу не модифікуючи конформацію самого білка каналу.

Нещодавно проведене дослідження показало, що у клітинах НЕК, в яких експресовано ВКСа-канали, утворені пороформуючою Slo1 та регуляторною  $\beta$ 1-субодиницями, ДГК стимулювала поодинокую активність каналу [141], ймовірно, завдяки зв'язуванню ДГК з комплексом каналу Slo1. Оскільки в ендотеліальних клітинах ВКСа-канали складаються лише з пороформуючої субодиниці  $\alpha$  [135], результати дослідження вказують на те, що допоміжна  $\beta$ 1-субодиниця не потрібна для ефекту ДГК.

Для подальшого розгляду механізму потенціації ВКСа-каналів за допомогою ДГК, ми дослідили вплив вилучення холестерину з мембрани на ефект ДГК. Холестерин — неодмінний компонент клітинних мембран еукаріотів, відіграє вирішальну роль у регуляції активності мембранних білків, включаючи іонні канали та транспортери [201, 202]. У наших експериментах виснаження мембранного холестерину за допомогою МЦД запобігало стимулюючій дії ДГК на ВКСа-канали, що дозволяє припустити, що ліпідний склад мембрани визначає стимулюючий ефект ДГК на ВКСа-канали.

Тобто, результати проведених нами досліджень вказують, що ДГК викликає гіперполяризацію ендотеліальних клітин за рахунок стимуляції ВКСа-каналів, таким чином, посилюючи рушійну силу входу  $Ca^{2+}$ . Клітинна чутливість до ДГК опосередковується мембранним холестерином, а зміна концентрації холестерину в окремих ліпідних рафтах може представляти потенційний механізм, завдяки якому омега-3 ПНЖК впливають на сигналізацію та функціонування клітин ендотелію.

*Гіперполяризація нестимульованих ендотеліальних клітин та пригнічення викликаної гіперполяризації лізофосфатидами*

Попередні дослідження вказують на тісний зв'язок між зниженою ендотелійзалежною релаксацією та підвищеним вмістом окиснених ЛФЛ [145, 203, 204, 205]. В дослідженні було продемонстровано, що ЛФІ та ЛФХ сильно пригнічують гіперполяризацію ендотеліальних клітин, викликану гістаміном. Інгібування було реверсним. Це спостереження та тривала стабільність гігаомних контактів у присутності ЛФХ та ЛФІ вказують на те, що ці ЛФЛ при концентрації до 10 мкМ пригнічують ендотелійзалежну релаксацію не через пошкодження ендотеліальних клітин, а через функціональну модуляцію специфічних іон-транспортуючих систем.

В дослідженні показано, що в ендотеліальних клітинах, ЛФІ і ЛФХ ефективно пригнічують струми  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінника. Інгібування ЛФІ та ЛФХ відбувалося в тому ж діапазоні концентрацій, що і пригнічення гіперполяризуючої реакції на гістамін. Варто зазначити, що при 10 мкМ, ЛФІ та ЛФХ сильно інгібували струми  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінника, навіть коли внутрішньоклітинні запаси  $Ca^{2+}$  не були виснажені попереднім впливом гістаміну. Таким чином, можна зробити висновок, що ЛФІ та ЛФХ пригнічують гіперполяризацію ЕК скоріше через пригнічення функції  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінника, ніж інгібування SOCE. Крім того, здатність ЛФІ та ЛФХ інгібувати базальний струм  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінника як при позитивних, так і негативних напругах вказує на те, що інгібуючий ефект не специфічний для режиму роботи  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмінника.

Оскільки інфузія клітин з GDPβS не змогла запобігти інгібуючій дії ЛФІ, результати далі вказують на те, що інгібуюча дія ЛФІ на Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обмінник не опосередковується GPCR. Крім Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обмінника, гіперполяризація ЕК на ацетилхолін частково опосередковується α1, але не α2 або α3 ізоформами Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФ-ази [134]. Нещодавно на ЕК показано, що ЛФІ пригнічує Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФ-азу [172], а отже, цей ефект може додатково сприяти гальмуванню гіперполяризації ендотелію. Оскільки ці ефекти ЛФІ відбуваються в одному і тому ж діапазоні концентрацій, ймовірно, що в їх основі лежать зміни властивостей плазматичної мембрани, а не пряма дія на конкретний білок. Результати дослідження виключають роль аніонів супероксиду в інгібуючому впливі ЛФІ на Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обмінник, оскільки застосування темполу (міметика супероксиддисмутази) не запобігло інгібуванню струму Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обмінника.

На культивованих HUVEC, було показано здатність окиснених ЛНЩ і, особливо, ЛФХ підвищувати рівень внутрішньоклітинного Ca<sup>2+</sup> за рахунок стимуляції входу Ca<sup>2+</sup> і, як наслідок, стимуляції ВКСа-каналів [157]. В даній роботі було показано, що ЛФХ стимулює активність ВКСа-каналів навіть при фіксованих Ca<sup>2+</sup> та напрузі, що дозволило ідентифікувати ЛФХ як прямий модулятор ВКСа-каналів.

Підводячи підсумок, ми показали, що ЛФХ має пряму модулюючу дію на активність ВКСа-каналів, що призводить до гіперполяризації ЕК. Цей нещодавно ідентифікований механізм дії ЛФІ та ЛФХ може лежати в основі пригнічення ендотелійзалежної релаксації та ендотеліальної дисфункції при патологічних станах, що супроводжуються підвищенням рівня цих ЛФЛ в крові та атеросклеротичним ураженням артерій.

## ВИСНОВКИ

В роботі досліджено механізми кардіопротекції під дією складових фосфоліпідів, які включають в себе наступні компоненти: стимуляцію ВКСа-каналів плазматичної мембрани ендотеліальних клітин та внутрішньої мітохондріальної мембрани кардіоміоцитів, зменшення чутливості мітохондріальних пор перемінної проникності до індуктора її переходу в стан високої проникності кальцію та модуляцію параметрів дихання мітохондрій.

1. Споживання омега-3 ПНЖК захищає інтерфібрилярну та субсарколемальну фракції мітохондрій міокарда щурів при навантаженні кальцієм, причому захисний ефект більш виражений щодо інтерфібрилярної фракції;
2. В умовах ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда середні величини набухання мітохондрій інтерфібрилярної та субсарколемальної фракцій міокарда щурів в безкальцієвому середовищі не розрізняються, що свідчить про однакову ступінь пошкодження цих субклітинних структур.
3. При експериментальному ізопротереноліндукованому пошкодженні міокарда тривале споживання омега-3 ПНЖК щурами призводить до нормалізації кінетики набухання мітохондрій в безкальцієвому середовищі. Захисний ефект є більш вираженим для інтерфібрилярної фракції. Споживання омега-3 ПНЖК частково, але істотно усуває ізопротереноліндуковані негативні зміни показників дихання мітохондрій (при стані дихання 3, показник дихального контролю та коефіцієнт АДФ/О)
4. Активація ВКСа-каналів мітохондрій серця при дії докозагексаєнової кислоти запобігає зростанню швидкості дихання в мітохондріальному стані 4 та зниження дихального контролю мітохондрій при перенавантаженні мітохондрій кальцієм
5. Аплікація докозагексаєнової кислоти безпосередньо потенціює активність ВКСа-каналів мітохондрій серця та ендотеліальних клітин, зумовлюючи гіперполяризацію останніх.

6. Наявність мембранного холестерину є критичним фактором у сигнальному шляху омега-3 ПНЖК — ВКСа-канали.
7. Лізофосфотидилхолін та лізофосфатидилінозитол здатні безпосередньо потенціювати активність ВКСа-каналів ендотеліальних клітин

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bjerregaard P, Dyerberg J Mortality from Ischaemic Heart Disease and Cerebrovascular Disease in Greenland International Journal of Epidemiology Vol. 17, No. 3 1988
2. Акопова ОВ, Колчинская ЛИ, Носарь ВИ, Бурый ВА, Маньковская ИН, Сагач ВФ. Влияние активатора АТР – зависимого  $K^+$ -канала на трансмембранный обмен калия и образование активных форм кислорода в условиях открывания митохондриальной поры Ukr. Biochem. J., 2014, Vol. 86, N 2
3. Shimanskaia TV, Strutinskaia NA, Vavilova GL, Goshovskaia IuV, Semenikhina EN, Sagach VF. Cyclosporin A-sensitive mitochondrial pore as a target of cardioprotective action of hydrogen sulfide donor. Ros Fiziol Zh im IM Sechenova. 2013 Feb 99(2):261-72. [Russian].
4. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection J Mol Cell Cardiol. 2015 Jan;78:100-6.
5. O'Rourke B. Evidence for mitochondrial  $K^+$  channels and their role in cardioprotection. Circ Res. 2004;94:420-432.
6. Oldenburg O, Cohen MV, Yellonc DM, Downey JM. Mitochondrial K channels: role in cardioprotection ATP Cardiovascular Research 55 (2002) 429–437
7. Singh H, Stefani E, Ligia T. Intracellular  $BK_{Ca}$  ( $iBK_{Ca}$ ) channels J Physiol 590.23 (2012) 5937–5947
8. Frankenreiter S, Bednarczyk P, Kniess A. cGMP-elevating compounds and ischemic conditioning provide cardioprotection against ischemia and reperfusion injury via cardiomyocyte-specific BK channels. Circulation 2017 136(24), 2337–2355
9. Blondeau N., Lauritzen I., Widmann C., Lazdunski M., Heurteaux C. A potent protective role of lysophospholipids against global cerebral ischemia and glutamate excitotoxicity in neuronal cultures. J Cereb Blood Flow Metab. 2002;22:821-834
10. Goswami SK, Ponnalagu D, Hussain AT, Shah K, Karekar P, Gururaja Rao S, Meredith AL, Khan M, Singh H. Expression and activation of  $BK_{Ca}$  channels in

- mice protects against ischemia-reperfusion injury of isolated hearts by modulating mitochondrial function. *Front. Cardiovasc. Med.* 2019 5:194.
11. Thrash JC, Boyd A, Huggett MJ, Grote J, P. Carini, R.J. Yoder, B. Robbertse, J.W.Spatafora, M.S. Rappe, S.J. Giovannoni. Phylogenomic evidence for a common ancestor of mitochondria and the SAR11 clade. *Sci. Rep.* 1 (2011) 13.
  12. Stotland A, Gottlieb RA. Mitochondrial quality control: Easy come, easy go *Biochimica et Biophysica Acta* 1853 2015 2802–2811
  13. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu S. ATP, Ca<sup>2+</sup>, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle *Am J Physiol Cell Physiol* 2004 287: C817–C833
  14. Guzman-Villanueva D, Weissig V. Mitochondria-Targeted Agents: Mitochondriotropics, Mitochondriotoxics, and Mitocans. *Handb Exp Pharmacol.*2017;240:423-438.
  15. Brenner C, Moulin M. Physiological roles of the transition pore *Circ Res.* 2012;111:1237-1247.
  16. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology* 2015 13:89
  17. Leanza L, Checchetto V, Biasutto L, Rossa A, Costa R, Bachmann M, Zoratti M, Szabo I. Pharmacological modulation of mitochondrial ion channels. *British Journal of Pharmacology* (2019) 176 4258–4283
  18. Kuznetsov AV, Usson Y, Leverve X, Raimund Margreiter R. Subcellular heterogeneity of mitochondrial function and dysfunction: Evidence obtained by confocal imaging. *Cellular Biochemistry* 256/257: 359–365, 2004.
  19. Sullivan EM, Pennington ER, Green WD, Beck MA, Brown DA, Shaikh SR. Mechanisms by which dietary fatty acids regulate mitochondrial structure-function in health and disease. *Adv Nutr* 2018;9:247–262
  20. Murphy MP. How understanding the control of energy metabolism can help investigation of mitochondrial dysfunction, regulation and pharmacology *Biochimica et Biophysica Acta* 1504 (2001) 1-11
  21. Fosslien E. Mitochondrial medicine – molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2001, vol. 31, 1,



22. Rossignol R, Letellier T, Malgat M, Rocher C, Mazat JP Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases *Biochem. J.* (2000) 347, 45±53
23. Benard G, Bellance N, Jose C, Melser S, Nouette-Gaulain K, Rossignol R. Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production *Biochimica et Biophysica Acta* 1797 2010 698–709
24. Adhihetty PJ, Ljubicic V, Menzies KJ, Hood DA. Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:C994-C1001.
25. O’Shea KM, Khairallah RJ, Sparagna GC, et al. Dietary omega-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:819-27.
26. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *Am J Physiol* 1986;250:H741-8.
27. Hoppeler H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 1986;7:187-204.
28. Riva A, Tandler B, Loffredo F, Vazquez E, Hoppel C. Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005. 289: H868–H872
29. Shimada T, Horita K, Murakami M, Ogura R. Morphological studies of different mitochondrial populations in monkey myocardial cells. *Tissue Res* 1984, 984; 238(3):577-82.
30. Hollander JM, Thapa D, Shepherd DL. Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014. 307: H1–H14.
31. Koves TR, Noland RC, Bates AL, Henes ST, Muoio DM, Cortright RN. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005 288: C1074–C1082.

32. Rosca MG, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2013 September; 18(5)
33. Cogswell AM., Stevens RJ, Hood DA. Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am. J. Physiol.* 1993 264 (Cell Physiol. 33): C383-C389, 1993.
34. Boengler K, Stahlhofen S, van de Sand A, Ruiz-Meana PGarcia-Dorado D, Heusch G, Schulz R. Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria. *Basic Res Cardiol* 2009 104:141–147.
35. Jimenez M, Yvon C, Lehr L, Le´ger B, Keller P, Russell A, Kuhne F, Flandin P, Giacobino JP, Muzzin P. Expression of uncoupling protein-3 in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria of various mouse muscle types and its modulation by fasting *Eur. J. Biochem.* 269, 2878–2884 (2002).
36. Monette JS, Gómez LA, Moreau RF, Bemer BA, Taylor AW, Hagen TM. Characteristics of the rat cardiac sphingolipid pool in two mitochondrial subpopulations. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 July 23; 398(2): 272–277.
37. Rosca MG, Hoppel CL. Mitochondria in heart failure *Cardiovascular Research.* 2010 88, 40–50
38. Holmuhamedov EL, Oberlin A, Short K, Terzic A, Jahangir A. Cardiac subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria display distinct responsiveness to protection by diazoxide. *PLoS ONE* 2012 7(9): e44667.
39. Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, D’Andrea E, Ferraro M, Liverini G, Iossa S. Heterogeneous bioenergetic behaviour of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria in fed and fasted rats. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2006,358–366
40. Lesnefsky EJ, Tandler B, Ye J, Slabe TJ, Turkaly J, Hoppel CL. Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria. *Am. J. Physiol.* 1997 273 (Heart Circ. Physiol. 42): H1544-H1554.
41. Galvao TF, Brown BH, Hecker PA, O’Connell KA, O’Shea KM, Sabbah HN, Rastogi S, Daneault C, Des Rosiers C, Stanley WC. High intake of saturated fat, but

- not polyunsaturated fat, improves survival in heart failure despite persistent mitochondrial defects. *Cardiovascular Research* 2012, 93, 24–32
42. Hofer T, Servais S, Seo AY, Marzetti E, Hiona A, Upadhyay SJ, Wohlgemuth SE, Leeuwenburgh C. Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: effects of aging and lifelong calorie restriction *Mech Ageing Dev.* 2009 May; 130(5): 297–307.
  43. Dedkova EN, Blatter LA. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  and the heart. *Cell Calcium* 2008 44, 77–91
  44. Mnatsakanyan N, Beutner G, Porter GA, Alavian KN, Jonas EA. .Physiological roles of the mitochondrial permeability transition pore *J Bioenerg Biomembr* 2017 Feb;49(1):13-25.
  45. Williams G, Boyman L, Lederer WJ. Mitochondrial calcium and the regulation of metabolism in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2014, 2015 Jan;78:35-45.
  46. Tarasov AI, Griffiths EJ, Rutter GA. Regulation of ATP production by mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ . *Cell Calcium* 2012 Jul;52(1):28-35.
  47. Pandya JD, Nukala VN, Sullivan RG. Concentration dependent effect of calcium on brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress parameters. *Frontiers in Neuroenergetics* 2013, 5, 10.
  48. Cao JL, Adaniya SM, Cypress MW, Suzuki Y, Kusakari Y, Jhun BS, O-Uchi J. Role of Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in cardiac muscles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2019 Mar 15;663:276-287
  49. Hroudová J, Fišar Z. Control mechanisms in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Neural Regen Res.* 2013;8(4):363-375.
  50. Frank N, Gellerich FN, Zemfira Gizatullina Z, Sonata Trumbeckaite S, Huu P, Nguyen HP, Arandarcikaite T, Vielhaber S, Seppet E, Striggow F. The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797 2010 1018–1027
  51. Johnston JD, Brand MD. Stimulation of the respiration rate of rat liver mitochondria by sub-micromolar concentrations of extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  *Biochem. J.* 1987 245, 217-222

52. Kavanagh NI, Ainscow EK, Brand MD. Calcium regulation of oxidative phosphorylation in rat skeletal muscle mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1457 2000 57-70
53. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *Am J Physiol* 1986;250:H741-8.
54. Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero F. Role of cardiolipin peroxidation and Ca<sup>2+</sup> in mitochondrial dysfunction and disease. *Cell Calcium* 45 2009 643–650
55. Wojtczak L, Więckowski MR. From mitochondrial large amplitude swelling to the permeability transition - a short historic overview. *Postepy Biochem* 2016;62(3):298-302.
56. Halestrap AP, Richardson AP, The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2015 Jan;78:129-41
57. Szabo I, Zoratti M. Mitochondrial Channels: Ion Fluxes and More. *Physiol Rev* 94: 519–608, 2014.
58. Biasutto L, Azzolin Mi, Szabò I, Zoratti M. The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016: An update. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863 2016 2515–2530
59. Briston T, Selwood DL, Szabadkai G, Duchen MR. Mitochondrial Permeability transition: a molecular lesion with multiple drug targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2019;40(1):50-70.
60. Brenner C, Moulin M. Physiological roles of the permeability transition pore. *Circ Res*. 2012;111:1237-1247
61. Šileikytė J, Forte M. The mitochondrial permeability transition in mitochondrial disorders *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019, Article ID 3403075, 11
62. Nguyen BY, Ruiz-Velasco A, Bui T, Collins L, Wang X, Liu W. Mitochondrial function in the heart: the insight into mechanisms and therapeutic potentials. *British Journal of Pharmacology* 2019 176 4302 – 4318
63. Giorgio V, Guo L, Bassot C, Petronilli V, Bernardi P. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium* 2018 Mar;70:56-63.

64. Belosludtsev KN, Dubinin MV, Belosludtseva NV, Mironova GD. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  Transport: Mechanisms, Molecular Structures, and Role in Cells Biochemistry (Moscow), 2019, Vol. 84, No. 6, pp. 593-607
65. Kwong JQ, Molkentin JD. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab.* 2015 February 3; 21(2): 206–214
66. Sorgato MC, Keller BU, Stuhmer W. Patch-clamping of the inner mitochondrial membrane reveals a voltage-dependent ion channel. *Nature.* 1987; 330:498–500
67. Vercesi AE, Castilho RF, Kowaltowski AJ, Oliveira H, de Souza-Pinto NC, Figueira TR, Busanello E. Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. *Free Radical Biology and Medicine* Free Radic Biol Med.2018 Dec;129:1-24
68. Stockum GS, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore, *Proc Natl Acad Sci USA* 110(15) (2013) 5887-92.
69. Alavian KN, Beutner G, Lazrove E, Sacchetti S, Park HA, Licznerski P, Li H, Nabili P, Hockensmith K, Graham M, Porter GA, Jonas EA. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 111(29) 10580-5
70. Bonora M, Bononi A, Marchi E, Giorgi C, Lebedzinska M, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Suski JM, Wojtala A, Wieckowski MR, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P. Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition, *Cell Cycle*, 2013 12:4,674-683.
71. Queenthly S, Stanely MP, Babu J. Diosmin prevents psoproterenol-pnduced heart mitochondrial oxidative stress in rats S. *Cardiovasc Toxicol Cardiovascular Toxicology.* 2018v18,pages120–130
72. Sivakumar R., Anandh Babu P.V., Shyamaladevi C.S. Protective effect of aspartate and glutamate on cardiac mitochondrial function during myocardial infarction in experimental rats. *Chem. Biol. Interact.* 2008. 176.P.227-33.

73. Izem-Meziane M., Djerdjouri B., Rimbaud S., Caffin F., Fortin D., Garnier A., Veksler V., Joubert F., Ventura-Clapier R. Catecholamine-induced cardiac mitochondrial dysfunction and mPTP opening: protective effect of curcumin. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2012. 302.-P.665-74
74. Hemalatha KL, P Stanely MP. Preventive effects of zingerone on cardiac mitochondrial oxidative stress, calcium ion overload and adenosine triphosphate depletion in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. *RSC Adv.*, 2016, 6, 112332
75. Finsterer J, Zarrouk-Mahjoub S. Mitochondrial toxicity of cardiac drugs and its relevance to mitochondrial disorders *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2015 11(1):15-24
76. Stanely MP, Balakrishnan S. Pretreatment with quercetin ameliorates lipids, lipoproteins and marker enzymes of lipid metabolism in isoproterenol treated cardiotoxic male Wistar rats. *European Journal of Pharmacology* 635 2010 142–148
77. Punithavathi VR, Shanmugapriya K, Stanely MP. Protective Effects of rutin on mitochondrial damage in isoproterenol-induced cardiotoxic rats: an In vivo and In vitro study. *Cardiovasc Toxicol* 2010 10:181–189
78. Punithavathi VR, Stanely MP Protective effects of combination of quercetin and  $\alpha$ -tocopherol on mitochondrial dysfunction and myocardial infarct size in isoproterenol-treated myocardial infarcted rats: biochemical, transmission electron microscopic, and macroscopic enzyme mapping evidences. *J Biochem Molecular Toxicology* 2010 V24, 5
79. Wang SB, Tian S, Yang F, Yang HG, Yang XY, Du GH. Cardioprotective effect of salvianolic acid A on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2009. 615.- P.125-32.
80. Queenthly S, Stanely MP, Babu J. Diosmin prevents isoproterenol-induced heart mitochondrial oxidative stress in rats. *Cardiovasc Toxicol* 2018 Apr;18(2):120-130.
81. Kumaran KS, Stanely MP. Caffeic acid protects rat heart mitochondria against isoproterenol-induced oxidative damage. *Cell Stress and Chaperones* 2010 15:791–806

82. Poderoso JJ, Fernandez S, Carreras MC, Del Bosco CG, Boveris A. Isoproterenol-dependent decrease in oxygen uptake and respiratory enzyme activities in rat myocardial tissue and mitochondria. *Crit Care Med.* 1995 Oct;23(10):1726-33.
83. Uyemura SA, Curti C. Respiration and mitochondrial ATPase in energized mitochondria during isoproterenol-induced cell injury of myocardium. *Int. J. Biochem.* 1991;23:P.1143-9.
84. Xu H, Martinoia E, Szabo I. Organellar channels and transporters. *Cell Calcium.* 2015 July 1; 58(1): 1–10.
85. Garlid KD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K<sup>+</sup> cycle. *Biochimica et Biophysica Acta* 1606 2003 23– 41
86. Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, Kunz WS. Mitochondrial Potassium Channels. *IUBMB Life*, 2009 61(2): 134–143
87. Nichols CG, Singh GK, Grange DK. KATP channels and cardiovascular disease: Suddenly a syndrome. *Circ Res.* 2013 March 29; 112(7): 1059–1072.
88. Bentzen B, Olesen SP, Rønn L. BKchannel activators and their therapeutic perspectives/ *Front Physiol.* 2014 Oct 9;5:389.
89. Szabo I, Zoratti M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev* 2014 94: 519 – 608
90. Li B, Gao TM. Functional role of mitochondrial and nuclear BK channels *International Review of Neurobiology.* 2016 128 ISSN 0074-7742
91. Heinen A, Camara AK, Aldakkak M, Rhodes SS, Riess ML, Stowe DF. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-induced K<sup>+</sup> influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 292: C148–C156.
92. Aldakkak M, Stowe DF, Cheng Q, Kwok WM, Camara A. Mitochondrial matrix K<sup>+</sup> flux independent of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel opening. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010 Mar;298(3):C530-41.
93. Heinen A, Winning A, Schlack W, Hollmann MW, Preckel B, Fräßdorf J, Nina C. Weber. The regulation of mitochondrial respiration by opening of mKCa channels is age-dependent. *European Journal of Pharmacology* 578 2008 108–113



94. Heinen A, Aldakkak M, Stowe DF, Rhodes SS, Riess ML, Varadarajan SG, Camara AK. Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007. 293: H1400–407
95. Duda MK, O'Shea KM, Stanley WC. ω-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for the treatment of heart failure: mechanisms and clinical potential *Cardiovascular Research* 2009 84, 33–41
96. Rohrbach S. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondria. *Current Pharmaceutical Design*, 2009, 15, 4103-4116
97. Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837 2014 408–417
98. Musatov A, Sedlák E. Role of cardiolipin in stability of integral membrane proteins. *Biochimie* 2017 Nov;142:102-111.
99. Arita K, Kobuchic H, Utsumia T, Takeharab Y, Akiyamad J, Hortone AA, Utsumi K. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochemical Pharmacology* 62 2001 821–828
100. Khairallah RJ, Sparagna GC, Khanna N , Karen M. O'Sheaa, Peter A. Heckera, Tibor Kristianc, Gary Fiskumc, Christine Des Rosiersd, Brian M. Polsterc, and William C. Stanley. Dietary supplementation with docosahexaenoic acid, but not eicosapentanoic acid, dramatically alters cardiac mitochondrial phospholipid fatty acid composition and prevents permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797:1555-62.
101. O'Shea KM, Khairallah RJ, Sparagna GC, Xu W, Hecker PA, Robillard-Frayne I, Des Rosiers C, Kristian T, Murphy RC, Fiskum G, Stanley WC. Dietary omega-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:819-27
102. Stavrovskaya IG, Bird SS., Marur VR, Sergei V. Baranov SV, Greenberg HK, Porter CL, Kristal BS. Dietary omega-3 fatty acids do not change resistance of rat



- brain or liver mitochondria to  $\text{Ca}^{2+}$  and/or prooxidant. *Journal of Lipids* Volume 2012, ID 797105, 13
103. Khairallah R.J., Kim J., O'Shea K.M., O'Connell K.A., Brown B.H., Galvao T., et al. Improved mitochondrial function with diet-induced increase in either docosahexaenoic acid or arachidonic acid in membrane phospholipids. *PLoS One*. 2012;7(3):e34402.
  104. Demaison L, Sergiel, Moreau D, Grynberg A. Influence of the phospholipid n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on the mitochondrial oxidative metabolism before and after myocardial ischemia. *Biochimica et Biophysica Acta* 1227 (1994) 53-59
  105. Herbst EA, Paglialunga S, Gerling C, Whitfield J., Mukai K, Chabowski A., Heigenhauser GJ, Spriet LL, Holloway GP. Omega-3 supplementation alters mitochondrial membrane composition and respiration kinetics in human skeletal muscle. *J Physiol* 592.6 2014 pp 1341–1352
  106. Yamaoka S, Urade R, Kito M. Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *J Nutr*, 1988 118 (3), 290-6
  107. Pepe S, Tsuchiya N, Lakatta EG, Hansford RG. PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and  $\text{Ca}^{2+}$  activation of PDH. *Am J Physiol* 1999 276.-P.149-58.
  108. Pepe S. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on age-related changes in cardiac mitochondrial membranes. *Experimental Gerontology* 40 (2005) 369–376
  109. Schönfeld P, Wojtczak L. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007 1767 1032–1040
  110. Devor DC, Frizzell RA. Modulation of  $\text{K}^{+}$  channels by arachidonic acid in T84 cells. II. Activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent  $\text{K}^{+}$  channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998 274: C149–C160
  111. Meves H. Modulation of ion channels by arachidonic acid. *Prog Neurobiol* 1994 43: 175–186

112. Ordway RW, Walsh JV Jr, Singer JJ. Arachidonic acid and other fatty acids directly activate potassium channels in smooth muscle cells. *Science* 1989 244: 1176–1179
113. Petit-Jacques J, Hartzell HC. Effect of arachidonic acid on the L-type calcium current in frog cardiac myocytes. *J Physiol* 1996 493: 67–81
114. Schwartz RD, Yu X. Inhibition of GABA-gated chloride channel function by arachidonic acid. *Brain Res* 199 585: 405–410
115. Sumida C, Graber R, Nunez E. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993 48: 117–122, 1993
116. Ordway RW, Singer JJ, Walsh JV Jr. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci* 1991 14: 96–100
117. Clarke AL, Petrou S, Walsh JV, Singer JJ. Modulation of BKCa channel activity by fatty acids: structural requirements and mechanism of action. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002. 283: C1441–1453
118. Kirber MT, Ordway RW, Clapp LH, Walsh JV Jr, Singer JJ. Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1992. 297: 24–28
119. Shaikh SR, Brown DA. Models of plasma membrane organization can be applied to mitochondrial membranes to target human health and disease with polyunsaturated fatty acids *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013 J ; 88(1): 21–25.
120. Zhang H, Li ZH, Zhang MQ, Katz MS, Zhang BX. Heat shock protein 90beta1 is essential for polyunsaturated fatty acid-induced mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  efflux. *J Biol Chem* 2008; 283: 7580-9.
121. Zhang BX, Ma X, Zhang W, Yeh CK, Lin A, Luo J, et al. Polyunsaturated fatty acids mobilize intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in NT2 human teratocarcinoma cells by causing release of  $\text{Ca}^{2+}$  from mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C1321-33.
122. Olszewska A, Bednarczyk P, Siemen D, Szewczyk A. Modulation of the mitochondrial large-conductance calcium-regulated potassium channel by polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837 2014 1602–1610

123. Shimokawa H, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Dietary omega 3 polyunsaturated fatty acids augment endothelium-dependent relaxation to bradykinin in coronary microvessels of the pig. *Br J Pharmacol.* 1988; 95: 1191-1196
124. Kim P, Shimokawa H, Vanhoutte PM. Dietary omega-3 fatty acids and endothelium-dependent responses in porcine cerebral arteries. *Stroke.* 1992; e 23: 407-413.
125. Christon RA. Mechanisms of action of dietary fatty acids in regulating the activation of vascular endothelial cells during atherogenesis. *Nutr Rev.* 2003; 61: 272-279.
126. Matsumoto T, Nakayama N, Ishida K, Kobayashi T, Kamata K. Eicosapentaenoic acid improves imbalance between vasodilator and vasoconstrictor actions of endothelium-derived factors in mesenteric arteries from rats at chronic stage of type 2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 329: 324-334.
127. Bondarenko A, Panasiuk O, Stepanenko L, Goswami N, Sagach V. Reduced hyperpolarization of endothelial cells following high dietary Na<sup>+</sup>: effects of enalapril and tempol, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39 (7) (2012) 608–613.
128. Sagach V, Bondarenko A, Bazilyuk O, Kotsuruba A. Endothelial dysfunction: Possible mechanisms and ways of correction. *Exp Clin Cardiol.* 2006; 11: 107-110.
129. Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Kohler R. Endothelial Ca<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2009; 157: 509-526.
130. Kohler R., Ruth P, Endothelial dysfunction and blood pressure alterations in K<sup>+</sup>-channel transgenic mice, *Pflugers Arch.* 459 (6) 2010 969–976.
131. Feletou M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol.* 2009; 156: 545-562.
132. Luckhoff A, Busse R. Activators of potassium channels enhance calcium influx into endothelial cells as a consequence of potassium currents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1990; 342: 94-99.
133. Bondarenko A. Sodium-calcium exchanger contributes to membrane hyperpolarization of intact endothelial cells from rat aorta during acetylcholine stimulation. *Br J Pharmacol.* 2004; 143: 9-18

134. Bondarenko A, Sagach V. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase is involved in the sustained ACh-induced hyperpolarization of endothelial cells from rat aorta. *Br J Pharmacol*. 2006; 149: 958-965.
135. Papassotiriou J, Kohler R, Prenen J, Krause H, Akbar M, Eggermont J, et al. Endothelial K(+) channel lacks the Ca(2+) sensitivity-regulating beta subunit. *FASEB J*. 2000; 14: 885-894.
136. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. 2010; 142: 687-698.
137. Wu Q, Wang H, Zhao X, Shi Y, Jin M, Wan B, et al. Identification of G-protein-coupled receptor 120 as a tumor-promoting receptor that induces angiogenesis and migration in human colorectal carcinoma. *Oncogene*. 2013; 32: 5541-5550.
138. Wang RX, Chai Q, Lu T, Lee HC. Activation of vascular BK channels by docosahexaenoic acid is dependent on cytochrome P450 epoxygenase activity. *Cardiovasc Res*. 2011; 90: 344-352.
139. Lai LH, Wang RX, Jiang WP, Yang XJ, Song JP, Li XR, et al. Effects of docosahexaenoic acid on large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in rat coronary artery smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2009; 30: 314-320.
140. Sandow SL, Grayson TH. Limits of isolation and culture: intact vascular endothelium and BKCa. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297: H1-7.
141. Hoshi T, Wissuwa B, Tian Y, Tajima N, Xu R, Bauer M, et al. Omega-3 fatty acids lower blood pressure by directly activating large-conductance Ca(2)(+)-dependent K(+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 4816-4821
142. Drzazga A, Sowinska A, Koziolkiewicz M. Lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylinositol—novel promising signaling molecules and their possible therapeutic activity. *Acta Pol. Pharm*. 2014 71 (6) 887–899.
143. Ouweneel AB, Van Eck M. Lipoproteins as modulators of atherothrombosis: from endothelial function to primary and secondary coagulation. *Vasc. Pharmacol*. 2016 82 1–10.

144. Colic M, Pantovic S, Jeremic M, Jokovic V, Obradovic Z, Rosic M. Transport of lowdensity lipoprotein into the blood vessel wall during atherogenic diet in the isolated rabbit carotid artery. *Circ. J.* 2015 79 (8) 1846–1852.
145. Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ. J.* 2009 73 (4) 595–601.
146. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J.Mol. Cell. Cardiol.* 1999 31 (1) 23–37.
147. Kruzliak P, Sabo J, Zulli A. Endothelial endoplasmic reticulum and nitrative stress in endothelial dysfunction in the atherogenic rabbit model. *Acta Histochem.* 2015 117 (8) 762–766.
148. Sonoki M, Iwase M, Iino K, Ichikawa K, Ohdo S, Higuchi S, Yoshinari M, Iida M. Atherogenic role of lysophosphatidylcholine in low-density lipoprotein modified by phospholipase A2 and in diabetic patients: protection by nitric oxide donor. *Metabolism* 2003 52 (3) 308–314.
149. Kohno M, Yokokawa K, Yasunari K, Minami M, Kano H, Hanehira H, Yoshikawa J. Induction by lysophosphatidylcholine, a major phospholipid component of atherogenic lipoproteins, of human coronary artery smooth muscle cellmigration. *Circulation* 1998 98 (4) 353–359.
150. Menon NK, Saito T, Wolf A, Bing RJ. Correlation of lysophosphatidylcholine-induced vs spontaneous relaxation to cyclic GMP levels in rabbit thoracic aorta. *Life Sci.* 1989 44 (9) 611–618.
151. Dudek R, Conforto A, Bing RJ. Lysophosphatidylcholine-induced vascular relaxation and production of cGMP are mediated by endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1993 203 (4) 474–479.
152. Hirayama T, Ogawa Y, Tobise K, Kikuchi K. Mechanism of endothelium-dependent vasorelaxation evoked by lysophosphatidylcholine. *Hypertens. Res.* 1998 21 (3) 137–145.
153. Yokoyama K, Ishibashi T, Ohkawara H, Kimura J, I. Matsuoka I, Sakamoto T, Nagata K, Sugimoto K, Sakurada S, Maruyama Y. HMG-CoA reductase inhibitors

- suppress intracellular calcium mobilization and membrane current induced by lysophosphatidylcholine in endothelial cells. *Circulation* 2002 105 (8) 962–967.
154. Su Z, Ling Q, Guo ZG. Effects of lysophosphatidylcholine on bovine aortic endothelial cells in culture. *Cardioscience* 1995 6 (1) 31–37.
155. Kim MY, Liang GH, Kim JA, Choi SS, Choi S, Suh SH. Oxidized low-density lipoprotein- and lysophosphatidylcholine-induced Ca mobilization in human endothelial cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2009 13 (1) 27–32.
156. Wong JT, Tran K, Pierce GN, Chan AC, Choy PC. Lysophosphatidylcholine stimulates the release of arachidonic acid in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1998 273 (12) 6830–6836.
157. Kuhlmann WCR, Wiebke Ludders D, Schaefer CA, Kerstin Most A, Backenkohler U, Neumann T, Tillmanns H, Erdogan A. Lysophosphatidylcholine-induced modulation of Ca(2+)-activated K(+)channels contributes to ROS-dependent proliferation of cultured human endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004 36 (5) 675–682.
158. Miwa Y, Hirata K, Kawashima S, Akita H, Yokoyama M. Lysophosphatidylcholine inhibits receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> mobilization in intact endothelial cells of rabbit aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997 17 (8) 1561–1567.
159. Cowan CL, Steffen RP. Lysophosphatidylcholine inhibits relaxation of rabbit abdominal aorta mediated by endothelium-derived nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor independent of protein kinase C activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995 15 (12) 2290–2297.
160. Huang TY, Chen HI, Liu CY, Jen CJ. Lysophosphatidylcholine alters vascular tone in rat aorta by suppressing endothelial [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signaling. *J. Biomed. Sci.* 2002 9 (4) 327–333.
161. Zhang R, Rodrigues B, MacLeod KM. Lysophosphatidylcholine potentiates phenylephrine responses in rat mesenteric arterial bed through modulation of thromboxane A<sub>2</sub>. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006 317 (1) 355–361.

162. Eizawa H, Yui Y, Inoue R, Kosuga K, Hattori R, Aoyama T, Sasayama S. Lysophosphatidylcholine inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and N omega-nitro-L-arginine/indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the porcine coronary artery. *Circulation* 1995 92 (12) 3520–3526.
163. Safaya R, Chai H, Kougiyas P, Lin P, Lumsden A, Yao Q, Chen C. Effect of lysophosphatidylcholine on vasomotor functions of porcine coronary arteries. *J. Surg. Res.* 2005 126 (2) 182–188.
164. Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma, Kitabatake A. Structural differences in the ability of lysophospholipids to inhibit endothelium-dependent hyperpolarization by acetylcholine in rat mesenteric arteries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996 227 (2) 479–483.
165. Rao SP, Riederer M, Lechleitner M, Hermansson M, Desoye G, Hallstrom S, Graier WF, Frank S. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on endothelium-dependent vasorelaxation. *PLoS One* 2013 8 (5), e65155.
166. Choi S, Park S, Liang GH, Kim JA, Suh SH. Superoxide generated by lysophosphatidylcholine induces endothelial nitric oxide synthase downregulation in human endothelial cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2010 25 (2–3) 233–240.
167. Froese DE, McMaster J, Man RY, Choy PC, Kroeger EA. Inhibition of endothelium-dependent vascular relaxation by lysophosphatidylcholine: impact of lysophosphatidylcholine on mechanisms involving endothelium-derived nitric oxide and endothelium derived hyperpolarizing factor. *Mol. Cell. Biochem.* 1999 197 (1–2) 1–6.
168. Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. Evidence for selective inhibition by lysophosphatidylcholine of acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in rat mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 1995 116 (1) 1541–1543.
169. Min Z, Kang L, Lin L, Jinghua F, Junna, Baolin L. Resveratrol restores lysophosphatidylcholine-induced loss of endothelium-dependent relaxation in rat aorta tissue coinciding with inhibition of extracellular-signal-regulated protein kinase activation. *Phytother. Res.* 2010 24 (12) 1762–1768.

170. Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T, Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007 362 (4) 928–934.
171. AlSuleimani YM, Hiley CR. The GPR55 agonist lysophosphatidylinositol relaxes rat mesenteric resistance artery and induces  $\text{Ca}^{2+}$  release in rat mesenteric artery endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 2015 172 (12) 3043–3057.
172. Bondarenko A, Waldeck-Weiermair M, Naghdi S, Poteser M, Malli R, Graier WF. GPR55-dependent and -independent ion signalling in response to lysophosphatidylinositol in endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 2010 161 (2) 308–320.
173. Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* 2001 81 (4) 1415–1459.
174. Wang X, Reznick S, Li P, Liang W, van Breemen C.  $\text{Ca}^{2+}$  removal mechanisms in freshly isolated rabbit aortic endothelial cells. *Cell Calcium* 2002 31 (6) 265–277.
175. Graier WF, Paltauf-Doburzynska J, Hill BJ, Fleischhacker E, Hoebel BG, Kostner GM, Sturek M. Submaximal stimulation of porcine endothelial cells causes focal  $\text{Ca}^{2+}$  elevation beneath the cell membrane. *J. Physiol.* 1998 506 (Pt 1) 109–125.
176. Bondarenko AI, Drachuk K, Panasiuk O, Sagach V, Deak AT, Malli R, Graier WF. N-arachidonoyl glycine suppresses  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry into endothelial cells and activates BK channels independently of G-protein coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2013 169 (4) 933–948.
177. Girardin NC, Antigny F, Frieden M. Electrophysiological characterization of storeoperated and agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathways in endothelial cells. *Pflugers Arch.* 2010 460 (1) 109–120.
178. Andrikopoulos P, Baba A, Matsuda T, Djamgoz MB, Yaqoob MM, Eccles SA.  $\text{Ca}^{2+}$  influx through reverse mode  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange is critical for vascular endothelial growth factor-mediated extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and angiogenic functions of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2011 286 (44) 37919–37931.
179. Панов АВ. Практическая митохондриология 2015 Новосибирск



180. Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content *Biochem. J.* (2005) 392, 353–362
181. Chance B., Williams Gr. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* 1956;17:65-134.
182. Estabrook R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol.* 1967;10:41-47.
183. Bukiya AN, Belani JD, Rychnovsky S, Dopico AM. Specificity of cholesterol and analogs to modulate BK channels points to direct sterol-channel protein interactions. *J Gen Physiol.* 2011; 137: 93-110.
184. Watanabe Y, Kimura J. Blocking effect of bepridil on  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange current in guinea pig cardiac ventricular myocytes. *Jpn. J. Pharmacol.* 2001 85 (4) 370–375.
185. Bondarenko AI, Malli R, Graier WF. The GPR55 agonist lysophosphatidylinositol directly activates intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels. *Pflugers Arch.* 2011 462 (2) 245–255.
186. Marchenko SM, Sage O. Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta. *J. Physiol.* 1993 462 735–751.
187. Bondarenko AI, Malli, Graier WF. The GPR55 agonist lysophosphatidylinositol acts as an intracellular messenger and bidirectionally modulates  $\text{Ca}^{2+}$ -activated large-conductance  $\text{K}^+$  channels in endothelial cells. *Pflugers Arch.* 2011 461 (1) 177–189.
188. Gil A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother.* 2002;56:388-96.
189. Radosinska J, Bacova B, Bernatova I, et al. Myocardial NOS activity and connexin-43 expression in untreated and omega-3 fatty acids-treated spontaneously hypertensive and hereditary hypertriglyceridemic rats. *Mol Cell Biochem.* 2011;347:163-73.
190. Garlid KD, Paucek P. The mitochondrial potassium cycle. *IUBMB Life* 2001;52:153-8.

191. Costa AD, Quinlan CL, Andrukhiv A, West IC, Jaburek M, Garlid KD. The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H406-15.
192. Holmuhamedov EL, Jahangir A, Oberlin A, Komarov A, Colombini M, Terzic A. Potassium channel openers are uncoupling protonophores: Implication in cardioprotection. *FEBS Lett*. 2004;568:167-70.
193. Garlid KD, Halestrap AP. The mitochondrial KATP channel—Fact or fiction? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2012 52 578–583
194. Bednarczyk P, Barker GD, Halestrap AP. Determination of the rate of K(+) movement through potassium channels in isolated rat heart and liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2008;1777:540-8.
195. Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F, Bernardi P. Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor-alpha apoptotic signaling. *J Biol Chem* 2001;276:12035-40.
196. Khairallah RJ, O'Shea KM, Brown BH, Khanna N, Des Rosiers C, Stanley WC. Treatment with docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, delays Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondria permeability transition in normal and hypertrophied myocardium. *J Pharmacol Exp Ther*.2010 Oct;335(1):155-62.
197. Hofer T, Servais S, Seo AY, et al. Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: Effects of aging and lifelong calorie restriction. *Mech Ageing Dev* 2009;130:297-307.
198. Bondarenko OI, Sahach VF. Electrical responses of aortic endothelium in spontaneously hypertensive rats. *Fiziol Zh*. 1994; 48: 75.
199. Bondarenko OI, Prysiazhna OD, Sahach VF. Electrical responses of intact aortic endothelium in rats with experimental diabetes. *Fiziol Zh*. 1994; 50: 3.
200. Kim MY, Liang GH, Kim JA, Kim YJ, Oh S, Suh SH, et al. Sphingosine-1-phosphate activates BKCa channels independently of G protein-coupled receptor in human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 290: C1000-1008.

201. Abramov AY, Ionov M, Pavlov E, Duchon MR. Membrane cholesterol content plays a key role in the neurotoxicity of beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell*. 2011; 10: 595-603.
202. Singh AK, McMillan J, Bukiya AN, Burton B, Parrill AL, Dopico AM, et al. Multiple cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) motifs in cytosolic C tail of Slo1 subunit determine cholesterol sensitivity of Ca<sup>2+</sup>- and voltage-gated K<sup>+</sup> (BK) channels. *J Biol Chem*. 2011; 287: 20509-20521.
203. d'Uscio LV, Smith LA, Katusic ZS. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxations in common carotid arteries of apolipoprotein e-deficient mice. *Stroke* 2001 32 (11) 2658–2664.
204. Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis. *Curr. Med. Chem*. 2007 14 (30) 3209–3220.
205. Zhang Y, Zhang W, Edvinsson L, Xu CB. Apolipoprotein B of low-density lipoprotein impairs nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric arteries. *Eur. J. Pharmacol*. 2014 725 10–17.
206. Zhao J, Majewski H. Endothelial nitric oxide attenuates Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger-mediated vasoconstriction in rat aorta. *Br. J. Pharmacol*. 2008 154 (5) 982–990.
207. Al Suleimani YM, Al Mahruqi AS, Hiley CR. Mechanisms of vasorelaxation induced by the cannabidiol analogue compound O-1602 in the rat small mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol*. 2015 765 107–114.
208. Fasolato C, Nilius B. Store depletion triggers the calcium release-activated calcium current (ICRAC) in macrovascular endothelial cells: a comparison with Jurkat and embryonic kidney cell lines. *Pflugers Arch*. 1998 436 (1) 69–74
209. Demaison L, Sergiel JP, Moreau D, Grynberg A. Influence of the phospholipid n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on the mitochondrial oxidative metabolism before and after myocardial ischemia. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Oct 21;1227(1-2):53-9.
210. Chapkin RS, Hong MY, Fan YY, Davidson LA, Sanders LM, Henderson CE, Barhoumi R, Burghardt RC, Turner ND, Lupton JR. Dietary n-3 PUFA alter

- colonocyte mitochondrial membrane composition and function. *Lipids* 2002 Feb;37(2):193-9.
211. Andersson D.C., Fauconnier J., Yamada T., Lacampagne A., Zhang S.J., Katz A. Westerblad Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the  $\beta$ -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J Physiol.* 2011 Apr 1;589(Pt 7):1791-801.
212. Bovo E., Lipsius S.L., Zima A.V. Reactive oxygen species contribute to the development of arrhythmogenic  $Ca^{2+}$  waves during  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation in rabbit cardiomyocytes. *J Physiol.* 2012 Jul 15;590(Pt 14):3291- 304.
213. Ott M., Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007 May;12(5):913-22.
214. Galindo M.F., Jordán J., González-García C., Ceña V. Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria. *Br J Pharmacol.* 2003 Jun;139(4):797-804.
215. Garrel C., Alessandri J.M., Guesnet P., Al-Gubory K.H. Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Jan;44(1):123-31.
216. Kusunoki C., Yang L., Yoshizaki T., Nakagawa F., Ishikado A., Kondo M., et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jan 4;430(1):225-30.
217. Bozcali E., Babalik E., Himmetoglu S., Mihmanli I., Toprak S.  $\omega$ -3 fatty acid treatment in cardiac syndrome X: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical study. *Coron Artery Dis.* 2013 Jun;24(4):328-33.
218. De Caterina R. n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2011 Jun 23;364(25):2439-50.
219. Di Paola M., Lorusso M. Interaction of free fatty acids with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Sep-Oct;1757(9-10):1330-7.

220. Wieckowski M.R., Wojtczak L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett.* 1998 Feb 27;423(3):339-42.
221. Takuwa Y., Takuwa N., Rasmussen H. The Effects of Isoproterenol on Intracellular Calcium Concentration. *J Biol Chem.* 1988 Jan 15;263(2):762-8.
222. Pepe S., Tsuchiya N., Lakatta E.G., Hansford R.G. PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca<sup>2+</sup> activation of PDH. *Am J Physiol.* 1999 Jan;276(1 Pt 2):H149-58.
223. Panasiuk O, Shysh A, Bondarenko A. Omega-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet differentially protects two subpopulations of myocardial mitochondria against Ca<sup>2+</sup>-induced injury. *Experimental & Clinical Cardiology.* 2013; 18(1):e60.
224. Chen Q, 17 Lesnefsky EJ. Depletion of cardiolipin and cytochrome c during ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain. *Free Radical Biology & Medicine* 40 (2006) 976 – 982

## ДОДАТОК 1. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

### Публікації, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Panasiuk O, Shysh A, Bondarenko A. Omega-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet differentially protects two subpopulations of myocardial mitochondria against Ca<sup>2+</sup>-induced injury. *Experimental & Clinical Cardiology*. 2013; 18(1):e60. (Особистий внесок здобувачки: особисто налагоджено метод виділення двох мітохондріальних фракцій міокардіальних клітин і проведено виділення мітохондрій для подальших експериментів, проведення всіх експериментальних досліджень, статистична обробка результатів, участь в плануванні дослідів та в підготовці матеріалів статті до публікації)
2. Panasiuk OS, Shysh AM, Moïbenko OO. The influence of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on functional parameters of myocardial mitochondria during isoproterenol-induced heart injury. *Fiziolohichniy zhurnal (Kiev, Ukraine)*. 2014; 60(1):18-24. (Особистий внесок здобувачки: проведення всіх експериментальних досліджень, статистичної обробки результатів дослідження, участь в підготовці матеріалів статті до публікації)
3. Panasiuk O, Bondarenko AI. Membrane cholesterol determines the stimulatory effect of omega-3 PUFA on BK channel activity. *Pharmacologia*. 2015;6(1):31-37. (Особистий внесок здобувачки: виконано частину експериментальних досліджень, участь в обговоренні та написанні статті)
4. Панасюк ОС, Шиш АМ, Мойбенко ОО. Омега-3 поліненасичені жирні кислоти нормалізують функцію мітохондрій, ферментів про- та антиоксидантної системи та експресію цитохрому Р450 2Е1 при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця. *Фізіол. журн*. 2016;62(2):64-71. (Особистий внесок здобувачки: виконано всю експериментальну частину на мітохондріях, написання частини статті, присвяченій мітохондріям)

5. Bondarenko A, Montecucco F, Panasiuk O, Sagach V, Sidoryak N, Brandt KJ, Mach F. GPR55 agonist lysophosphatidylinositol and lysophosphatidylcholine inhibit endothelial cell hyperpolarization via GPR-independent suppression of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> refilling. *Vascular pharmacology*. 2017/2/28;89:39-48. (Особистий внесок здобувачки: виконано частину експериментальних досліджень, участь у підготовці матеріалів до друку)
6. О.С. Панасюк, О.І. Бондаренко. Участь кальційзалежних калієвих каналів великої провідності в модуляції параметрів дихання мітохондрій міокарда докозагексаєновою кислотою. *Фізіол. журн.* 2020;66(6): 74-81. (Особистий внесок здобувачки: виконано частину експериментальних досліджень, участь у підготовці матеріалів до друку і написанні статті)

**Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. Panasiuk O, Moybenko O. Different sensitivities of two mitochondrial subpopulations to calcium-induced injury after omega-3 PUFA feeding. 2nd International Graz symposium on lipid and membrane biology: focus on lipotoxicity. 2008 March 13-15; Graz, Austria. (Публікація тез, участь у постерній сесії).
2. Panasiuk O, Moybenko O. Interfibrillar mitochondria in ω-3 PUFA-fed rats exhibit a higher resistance to calcium than subsarcolemmal ones. *J of Mol Cel Cardiol.* 2008;44 (4):806 (Публікація тез).
3. Панасюк ОС, Шиш АМ, Мойбенко ОО. Омега-3 поліненасичені жирні кислоти попереджають набухання субсарколемальної та інтерфібрилярної фракцій мітохондрій міокарда. VI конг. патофізіол. України; 2012 3-5 жовт., Місхор, Україна. *Таврический медико-биологический вестник.* 2012;15(3), Ч.1(59):254-256. (Публікація тез).
4. Panasiuk O. Different sensitivities of two mitochondrial subpopulations to calcium-induced injury. 2nd MiP summer school on mitochondrial respiratory physiology. 2008 July 12-18; Schröcken, Vorarlberg, Austria. (Публікація тез).

5. Панасюк ОС, Шиш АМ, Мойбенко ОО. Вплив омега-3 поліненасичених жирних кислот на показники функціонування мітохондрій міокарда при ізопроterenоліндукованому пошкодженні серця. Матер. VI пленуму наук. т-ва патофізіол. України та наук.-практ. конф. за участю міжнар. спеціалістів "Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології". 2014:71-73. (Публікація тез).
6. Bondarenko A, Panasiuk O, Okhai I, Brandt KJ, Montecucco F, Mach F. Alterations of IKCa-mediated endothelial electrical signaling in a murine model of atherosclerosis. European journal of clinical investigation. 2017/5/1 47;129-129. (Публікація тез, участь у постерній сесії).
7. Shysh A.M., Panasiuk O.S., Maksymchuk O.V., Dosenko V.E. The influence of omega-3 polyunsaturater fatty acids on mitochondria swelling, enzymes of prooxidant-antioxidant system and expression of cytochrome P450 2E1 after isoproterenol-induced myocardial injury // 5-й з'їзд Українського тов. клітинної біології з міжн. представництвом. 2-6 жовтня 2016. Одеса. - P28. (Публікація тез)

**Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації:**

1. Panasiuk OS, Shysh AM, Moibenko OO. Effects of dietary  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids on myocardial mitochondria functioning under isoproterenol-induced heart damage. International Journal of Physiology and Pathophysiology. 2015;6(1) (Особистий внесок здобувачки: проведення експериментальних досліджень, статистичної обробки результатів дослідження, участь в підготовці матеріалів статті до публікації)
2. Panasiuk OS, Shysh AM, Dosenko VE, Moibenko OO. Omega-3 polyunsaturated fatty acids normalize the functions of mitochondria, pro-and antioxidant enzymes of, and cytochrome P450 2e1 expression after isoproterenol-induced myocardial injury. International Journal of Physiology and Pathophysiology. 2017;8(2) (Особистий внесок здобувачки: виконано експериментальну частину на мітохондріях, участь в підготовці матеріалів до друку)