

В.Ф. Сагач, О.В. Рудик, Г.Л. Вавілова, А.В. Коцюруба, Ю.П. Ткаченко

Мелатонін відновлює ішемічну толерантність і зменшує чутливість відкривання мітохондріальної пори в серці старих щурів

Исследовали влияние гормона эпифиза мелатонина на ишемическую толерантность и чувствительность митохондриальной поры (МП) к ее индукторам в сердце старых крыс. На модели изолированного по Лангендорфу сердца крысы установлено, что изменения его сократительной функции в условиях ишемии и реперфузии являются более выраженными у старых (24–27 мес) крыс по сравнению со взрослыми (5–6 мес) животными. Двухнедельное введение in vivo старым крысам мелатонина (1,5 мг/кг) способствовало более эффективному восстановлению функциональных показателей изолированного сердца при ишемии и реперфузии по сравнению с животными, которым не вводили этот препарат, а также уменьшало чувствительность МП к ее индукторам – Ca^{2+} и фениларсиноксида. Это сопровождалось значительным снижением уровня экспрессии мРНК проапоптотического белка bax в сердце старых крыс, уменьшением генерации супероксидного радикала, диеновых конъюгатов, а также повышением вдвое активности конститутивной изоформы синтазы оксида азота в митохондриях сердца старых крыс после курсового введения им мелатонина. Результаты экспериментов, в которых установлен коррелирующий относительно открывания МП эффект мелатонина, могут служить основой для рекомендации его применения с целью коррекции функциональных нарушений сердца при старении организма.

ВСТУП

За даними ВООЗ нині серед людей похилого віку спостерігається ускладнення перебігу хвороб серцево-судинної системи [23], що часто призводить до розвитку інших залежних від віку патологічних станів. Поряд з тим, що процес старіння характеризується розладом фізіологічних функцій організму та зменшенням його адаптивних можливостей до виживання, показано [15, 20, 24], що він супроводжується зниженням властивої для міокарда резистентності до ішемічно-реперфузійних ушкоджень. Причини втрати подібної ішемічної толерантності міокардом розглядаються у світлі вільнорадикальної теорії старіння [19], однак залишаються все ще недостатньо зрозумілими. Протягом останнього десяти-

річчя було висунуто декілька альтернативних гіпотез щодо уявлення про роль мітохондрій у процесі старіння [4, 25, 33]. Однією з них є так звана „кальцієва гіпотеза старіння” [4], згідно з якою в основі важливих проявів цього фізіологічного процесу є зміни кальцієвого гомеостазу в результаті порушення функціонування одного з кальцієвих депо – мітохондрій. Важливим напрямком є дослідження зміни чутливості мітохондріальної пори (МП) до індукторів її відкривання, зокрема до Ca^{2+} , при різних порушеннях клітинних функцій [33]. В останні роки вивчення ролі МП при патологічних станах набуває все більшої актуальності. Зокрема, неодноразово продемонстровано, що індукція відкривання МП є однією з ланок патогенезу таких станів, як ішемічно-реперфузійні ушкод-

© В.Ф. Сагач, О.В. Рудик, Г.Л. Вавілова, А.В. Коцюруба, Ю.П. Ткаченко

ження серця та мозку, гіпоксичні стани, діабет, хвороба Паркінсона тощо [14, 18, 33]. Більше того, серед причин захворювань м'язової, нервової та імунної систем організму, що розвиваються з віком, називають дисфункцію мітохондрій, пов'язану безпосередньо з підвищеною чутливістю МП до її індукторів [27, 28, 30, 33]. У попередній роботі нами було показано, що мітохондрії, ізольовані з серця старих щурів, характеризуються підвищеною чутливістю до індукторів відкриття МП – Ca^{2+} та окисників у порівнянні з дорослими тваринами, ймовірно, внаслідок підвищення експресії мРНК проапоптотичного білка *bax* і підвищення проникності мітохондріальних мембран у серці старих щурів [5]. Отже, збільшення чутливості мітохондрій серця до індукторів МП може бути важливим показником не тільки пригнічення з віком функціонального стану кардіоміоцитів, але й підставою для прогнозування підвищеної чутливості цих клітин до їх можливої загибелі.

З іншого боку, вже протягом другого десятиріччя ведеться пошук нетоксичних речовин з інгібуючим ефектом щодо відкриття МП. Дослідження впливу речовин із потенційно модулюючою щодо зміни чутливості МП дією, зокрема антиоксидантів, які широко застосовують для попередження розвитку деяких патологічних станів людини з віком, представляють значний інтерес для корекції функціональних змін серця [2]. Такий інтерес зумовлений тим, що довготривале використання цих речовин *in vivo* є ефективним щодо зменшення кількості вільних радикалів, які накопичуються при старінні [7]. Крім того, відомо, що деякі геропротектори з антиоксидантною дією, зокрема гормон епіфіза мелатонін, можуть відігравати роль інгібіторів відкриття МП [8].

Метою нашої роботи було проаналізувати вплив курсового введення мелатоніну *in vivo* старим щурам на ефективність відновлення скоротливої функції серця за умов

його ішемії–реперфузії, на чутливість відкриття МП до Ca^{2+} та феніларсиноксиду (ФАО), на інтенсивність вільнорадикальних процесів і експресію мРНК *bax* у серці.

МЕТОДИКА

В експериментах використовували білих щурів-самців лінії Вістар віком 5–6 міс (дорослі) та 24–27 міс (старі), з дотриманням усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Реєстрація показників скоротливої функції ізольованого серця щурів. Експериментальних тварин наркотизували за допомогою уретану 120 мг/кг (“Sigma”, США). Серце вилучали розтином грудної порожнини, одразу поміщали в охолоджений розчин Кребса–Хензеляйта (ммоль/л): NaCl – 118, KCl – 4,7, MgSO_4 – 1,2, NaHCO_3 – 24, KH_2PO_4 – 1,2, глюкоза – 10, CaCl_2 – 2,5, рН 7,4) і витримували до повної зупинки. Потім серце підвішували за аорту до металевій канюлі за допомогою лігатур і ретроградно перфузували розчином Кребса–Хензеляйта при 37°C за класичним методом Лангендорфа при постійному перфузійному тиску. Після 20-хвилинного періоду напрацювання серця, що означало встановлення рівноваги показників, що реєстрували, проводили 30-хвилинну тотальну ішемію за допомогою повного перекривання перфузійного потоку з наступною 40-хвилинною реперфузією. Стан скоротливої функції лівого шлуночка оцінювали за змінами його тиску ($P_{\text{лш}}$) і швидкісних показників скорочення (dP/dt_{max} і dP/dt_{min}). Для порівняння показників скоротливої функції обох вікових груп, значення $P_{\text{лш}}$, dP/dt_{max} і dP/dt_{min} реєстрували в міліметрах ртутного стовпа і міліметрах ртутного стовпа за 1 с відповідно і виражали у відсотках. Коронарний потік вимірювали за об'ємом розчину, що відтікав від ізольованого серця за 1 хв.

Дослідження відкриття мітохондріальної пори. Серця видаляли у тварин після декапітації та ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином КСІ. Мітохондрії виділяли за описаним методом диференційного центрифугування [3] в нашій модифікації. Дослідження відкриття МП проводили за допомогою спектрофотометричної реєстрації набування мітохондрій серця щурів. Для цього ізольовані мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): КСІ – 120, тріс-НСІ – 25, KH_2PO_4 – 3, сукцинат натрію – 5; рН 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і за допомогою спектрофотометра реєстрували зниження їх оптичної густини при $\lambda=520$ нм за 5 хв до і через 15 хв після їх набування при дії індуктора в інкубаційному середовищі. Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [26]. Концентрація білка в інкубаційному середовищі становила 0,3 мг/мл. Як контроль використовували суспензію нативних мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора з реєстрацією оптичної густини протягом 20 хв.

Визначення експресії мРНК. РНК виділяли з тканин серця щурів методом кислої фенольної екстракції за допомогою комерційної тест-системи “РИБО-золь” (Центральний науково-дослідний інститут епідеміології РФ). Зворотну транскрипцію, або синтез комплементарної до РНК молекули ДНК, проводили, використовуючи чутливий фермент М-MLV-ревертазу та випадкові гексануклеотиди з набору реагентів “РЕВЕРТА-R-100”. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за допомогою комерційної тест-системи “Амплі-Сенс-200-1” на приладі “АМПЛИКОН-24” (Україна) з використанням олігонуклеотидних праймерів (“SYNTOL», Росія; 30 пкмоль/мл), комплементарних до відповідних ділянок генів *baх* (смысловий праймер 5' – GTT TCA TCC AGG ATC GAG CAG – 3' і антисмысловий 5' – CAT CTT

СТТ САА GAT GGT GA – 3'), і *gapdh* як внутрішній контроль (смысловий праймер 5' – TGC ATC CTG CAC CAC САА СТ – 3' і антисмысловий 5' – TGC CTG CTT CAC CAC CTT С – 3') за описаною методикою [31]. Про зміни рівня експресії судили за зміною інтенсивності флуоресценції смуг на електрофореграмах. Візуалізацію та обробку результатів проводили за допомогою відео-тест системи (“VITRAN”, Росія).

Визначення вмісту окремих показників вільнорадикальних процесів. Для визначення вмісту пероксиду водню (H_2O_2) аликвоти проб гомогенату тканин серця або суспензії мітохондрій, ізольованих із серця щурів (100–250 мкг білка), додавали у кварцеву кювету, що містила 2 мл розчину КJ (0,1 моль/л) і надлишок лактопероксидази (50 нмоль/л) у фосфатному буфері (0,05 моль/л, рН 7,3). Зміни екстинкції проб реєстрували спектрофотометрично при $\lambda=353$ нм. Вміст H_2O_2 виражали в пікомолях на 1 мг білка, використовуючи його коефіцієнт молярної екстинкції $\epsilon=26\,000$ моль⁻¹ · см⁻¹ [24]. Вміст супероксидного радикала (O_2^-) у гомогенатах тканин серця або суспензії мітохондрій, ізольованих із серця щурів, визначали за окисненням цитохрому *c* у тріс-НСІ буфері (10 ммоль/л) при 37°C, рН 7,4 [22], фіксуючи зміни екстинкції після інкубації проби при 37°C протягом 30 хв при $\lambda=550$ нм. Вміст (O_2^-), генерованого пробами під час інкубації, визначали за коефіцієнтом молярної екстинкції $\epsilon=21\,000$ моль⁻¹ · см⁻¹. Для визначення вмісту гідроксильного радикала (OH^- -радикала) готували інкубаційну суміш у складі (ммоль/л): дезоксирибоза – 20, H_2O_2 – 1, натрій-фосфатний буфер – 20, рН 7,4. Вміст білка в пробі гомогенату тканин серця становив 100–250 мкг/мл. Пробу інкубували при 37°C протягом 60 хв, після чого додавали 0,5 мл 1%-го розчину тіобарбітурової кислоти в розчині NaOH (50 моль/л) і 0,5 мл 2,8 %-го розчину трихлор-оцтової кислоти. Отриману суміш розчинів витримували 20 хв на водяній бані при

100°C, охолоджували і реєстрували величину екстинції при $\lambda=532$ нм. Вміст ^-OH -радикала, що генерувався при цьому, виражали в умовних одиницях $\Delta E \cdot 10^2$ за 60 хв інкубації на 1 мг білка проби [13]. Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у гомогенаті та мітохондріях серця оцінювали за вмістом дієнових кон'югатів (ДК) – одного з проміжних продуктів ПОЛ. Для визначення вмісту ДК проводили екстракцію проб додаванням до 0,2 мл гомогенату тканин серця чи суспензії мітохондрій, ізольованих із серця щурів, 1 мл суміші гептану та ізопропанолу (1:1) [1]. Для розділення фаз додавали 0,1 мл дистильованої H_2O , швидко струшували проби та давали час для відстоювання, після чого відбирали верхню гептанову фазу. Оптичну густину гептанової фази визначали при $\lambda=232$ нм. Як контроль використовували гептанові екстракти дистильованої води.

Визначення активності синтаз оксиду азоту (cNOS та i-NOS). Активність синтаз оксиду азоту (NO-синтаз) у мітохондріях серця щурів визначали за допомогою класичного методу [12, 29] в модифікації для спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – нітрит-аніона [32]. Для цього об'єм субстратної суміші збільшували в 10 разів і визначали активність ферменту в середовищі з мінімальною кількістю кофакторів з метою наближення активності NO-синтаз до базального рівня активності NOS у досліджуваних суспензіях. Аліквоти суспензії ізольованих мітохондрій серця щурів інкубували в загальному об'ємі 1 мл субстратної суміші такого складу (мкмоль/л): KH_2PO_4 – 50, MgCl_2 – 1, CaCl_2 – 2; НАДФ – 1, L-аргінін – 2, рН – 7 протягом 60 хв при 37°C. Після цього реакцію зупиняли додаванням 0,3 мл 2N розчину HClO_4 . Як контроль використовували проби, що містили повну субстратну суміш і білок, попередньо денатурований 2N розчином HClO_4 , які центрифугували при 3500 хв^{-1} протягом 10 хв. У надосадовій

рідині досліджуваних проб визначали вміст NO_2 . Активність Ca^{2+} -незалежної ізоформи NOS, яка відповідає індукбельній ізоформі NOS (iNOS) [10], визначали так само, додаючи в інкубаційне середовище розчин ЕГТА (4 ммоль/л) замість CaCl_2 [17]. Активність кальційзалежної ізоформи NOS, яка відповідає конститутивній ізоформі NOS (cNOS) [10], розраховували як різницю між загальною активністю NOS і активністю Ca^{2+} -незалежної ізоформи NOS. Активність ферментів виражали у пікомолях NO, який утворювався за 1 хв у розрахунку на 1 мг загального білка в пробі.

Курсове введення старим щурам мелатоніну. Курсове введення старим щурам мелатоніну здійснювали за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції препарату у другій половині дня (1,5 мг/кг) протягом 14 діб перед початком експерименту. Експерименти на ізольованому серці, ізольованих мітохондріях та біохімічні дослідження проводили на наступну добу після останнього введення мелатоніну.

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики з використанням програм Excel (MS Office XP) та Origin 6.0 (Microcall Inc, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У досліджах на ізольованому серці, в гомогенаті серця та ізольованих мітохондріях вивчали вплив курсового введення старим щурам мелатоніну на скоротливу функцію серця, відкриття МП, інтенсивність вільнорадикальних процесів, активність NOS та експресію мРНК *ba α* .

Вплив курсового введення мелатоніну на скоротливу функцію серця старих щурів. Результати експериментів на ізольованому серці показали, що 40-хвилинна реперфузія після 30-хвилинної тотальної ішемії серця дорослих щурів призводить до загального пригнічення скоротливої функції серця: пониження P_{max} та його першої похідної, знижен-

ня коронарного потоку. Однак для старих тварин ці зміни є більш вираженими, ніж для дорослих. Зокрема, встановлено, що $P_{\text{лш}}$ на 5-й хвилині реперфузії ізолюваного ішемізованого серця дорослих щурів відновлювався до $57\% \pm 6\%$ відносно вихідного рівня, в той час як цей показник для старих тварин становив усього $19\% \pm 6\%$, що майже втричі менше від такого у дорослих тварин. Значення $P_{\text{лш}}$ для серця старих щурів достовірно відрізнялися порівняно зі значеннями у дорослих тварин протягом усіх часових проміжків періоду реперфузії, які реєстрували і становили $61\% \pm 4\%$ відносно вихідного значення в дорослих і лише $44\% \pm 6\%$ у старих щурів на 40-й хвилині реперфузійного періоду.

Показано, що швидкість підвищення $P_{\text{лш}}$ – dP/dt_{max} – та динаміка зниження $P_{\text{лш}}$ з часом, що відображає показник dP/dt_{min} , при реперфузії ізолюваного серця старих щурів мали тенденцію до більш вираженого зниження у порівнянні з дорослими тваринами, однак достовірні відмінності спостерігали тільки на початку реперфузійного періоду. Зокрема, різниця значень ступеня відновлення функції ізолюваного серця на 5-й хвилині реперфузії для обох груп тварин становила в середньому 31 і 25% для dP/dt_{max} і dP/dt_{min} відповідно. Значення коронарного потоку при реперфузії ізолюваного ішемізованого серця дорослих і старих щурів достовірно не відрізнялися. Таким чином, функціональні зміни роботи серця, що реєстрували, свідчать про деяке погіршення відновлення скоротливої функції міокарда старих щурів при ішемії та реперфузії у порівнянні з дорослими тваринами.

Курсове двотижневе введення мелатоніну старим щурам виявило коригуючий ефект щодо відновлення окремих функціональних показників роботи ізолюваного ішемізованого серця при його реперфузії. Зокрема в цій дослідній групі тварин спостерігали достовірне збільшення $P_{\text{лш}}$ (рис. 1,а), а також швидкісних показників dP/dt (див.

рис. 1,б) протягом усього періоду реперфузії порівняно з серцем старих тварин, яким не вводили мелатонін. Так, на 40-й хвилині реперфузії ізолюваного серця старих щурів,

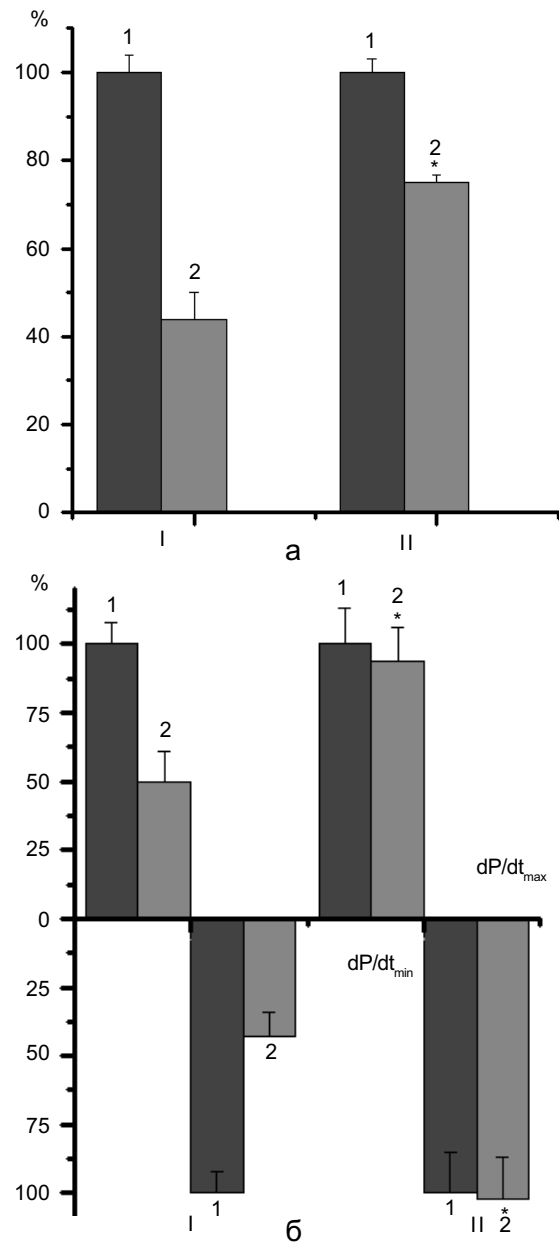


Рис.1. Відновлення скоротливої функції серця за умов його ішемії–реперфузії після впливу курсового введення старим щурам мелатоніну: а – тиск, що розвиває лівий шлуночок; б – dP/dt ; I – контроль (n=11); II – введення мелатоніну (n=5). 1 – вихідні значення, 2 – значення на 40-й хвилині реперфузії.* тут і на рис.2 різниця порівняно з контролем достовірна

яким вводили мелатонін, $P_{\text{лш}}$ становив $75\% \pm 2\%$ відносно вихідного значення. Це в середньому на 31% більше від цього показника в серці старих щурів, яким не вводили курсом мелатонін (див.рис.1, а). Значення dP/dt_{max} на 40-й хвилині реперфузії в групі з мелатоніном у середньому на 44% перевищувало значення dP/dt_{max} контрольних старих щурів і становило $94\% \pm 12\%$ (див.рис.1,б). Показано, що значення dP/dt_{min} на 40-й хвилині реперфузії ізольованого серця старих щурів, яким вводили мелатонін, у середньому на 59% перевищувало значення dP/dt_{max} серця контрольних старих щурів і становило $102\% \pm 15\%$ (див.рис.1,б). Крім того, під час реперфузії ішемізованого серця старих щурів після курсового введення мелатоніну значення коронарного потоку достовірно перевищували такі для старих щурів, яким не вводили препарат як до ішемії (вихідні значення), так і протягом усіх часових проміжків, що реєстрували під час реперфузії (рис.2).

Таким чином, можна стверджувати, що курсове введення мелатоніну ефективно впливає на відновлення скоротливої функції серця старих щурів під час реперфузії після тотальної його ішемії, а також, імовірно, на функціональний стан коронарних судин.

Вплив курсового введення мелатоніну старим щурам на чутливість відкривання мітохондріальної пори до Ca^{2+} і ФАО. Для перевірки припущення, що коригуючий ефект курсового введення мелатоніну щодо стану скорот-

ливої функції серця старих щурів при його ішемії–реперфузії може бути зумовлений тривалим пригніченням відкривання МП у серці, досліджували його вплив на чутливість мітохондрій серця старих щурів до таких індукторів МП, як Ca^{2+} (10^{-4} моль/л) і феніларсиноксид (10^{-5} і 10^{-4} моль/л). У дослідках на ізольованих мітохондріях показано, що мітохондрії серця старих щурів, яким курсом вводили мелатонін, мають значно меншу величину набухання за умов дії Ca^{2+} порівняно зі старими тваринами (рис. 3,а). Зокрема, величина набухання таких мітохондрій при дії Ca^{2+} зменшувалася майже вдвічі у порівнянні зі значенням у контрольних старих тварин, яким не вводили препарат, і наближалася до значення у дорослих тварин [5].

Крім того, у старих щурів, яким вводили мелатонін, спостерігали значне пригнічення

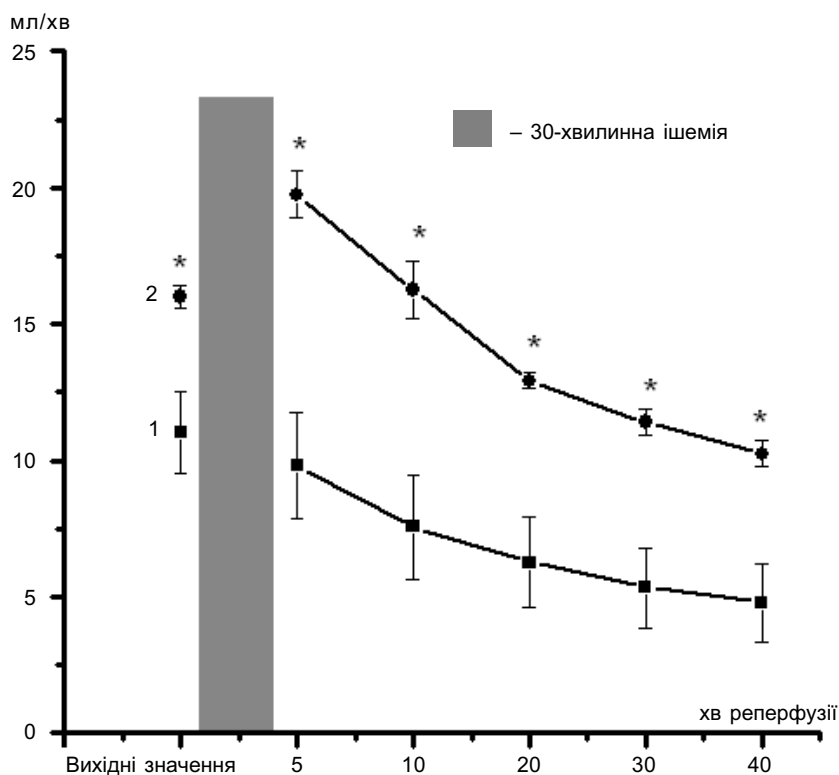


Рис.2. Зміна коронарного потоку в ізольованому серці за умов його ішемії і реперфузії після впливу курсового введення мелатоніну: 1 – контроль (n=11); 2 – введення мелатоніну (n=5)

ФАО-індукованого набухання мітохондрій серця. Для таких мітохондрій характерне зменшення величини їх набухання за умов дії ФАО в концентрації 10^{-5} моль/л порівняно зі старими тваринами (рис. 3,б). Навіть введення ФАО в концентрації 10^{-4} моль/л не призводило до такого значного набухання мітохондрій серця шурів, яким вводили мелатонін, яке спостерігається на мітохондріях серця старих шурів за умов дії ФАО в

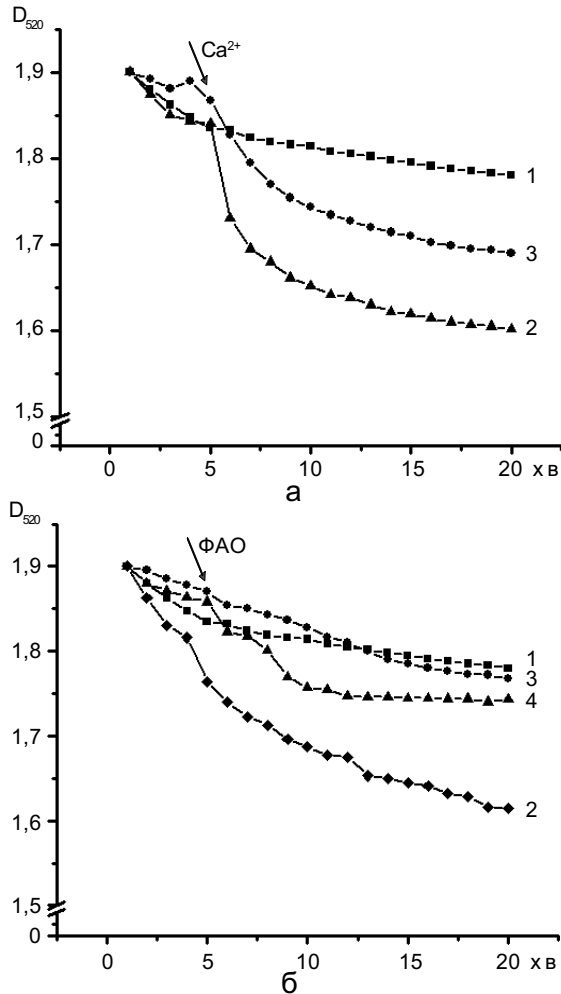


Рис.3. Типові криві кальційіндукованого набухання мітохондрій (а): 1 – контроль; 2 – дія Ca^{2+} на мітохондрії серця старих тварин; 3 – дія Ca^{2+} на мітохондрії серця старих шурів, яким вводили мелатонін. Типові криві ФАО-індукованого набухання мітохондрій (б): 1 – контроль; 2 – дія ФАО (10^{-5} моль/л) на мітохондрії серця старих шурів; 3, 4 – дія ФАО (10^{-5} моль/л і 10^{-4} моль/л відповідно) на мітохондрії серця старих шурів, яким вводили мелатонін

концентрації 10^{-5} моль/л. Це свідчить про те, що курсове введення мелатоніну зменшує чутливість ФАО-індукованого відкриття МП не менше як на 1–2 порядки і наближає її до такої у дорослих тварин. Циклоспорин А (10^{-5} моль/л) повністю інгібував ФАО-індуковане набухання мітохондрій серця старих шурів із курсовим введенням мелатоніну. Цього не спостерігали на мітохондріях серця контрольних старих тварин, яким не вводили мелатонін, і для яких, як було показано нами раніше [5], характерне часткове інгібування циклоспорином А ФАО-індукованого набухання мітохондрій.

Отже, курсове введення мелатоніну старим щурам сприяє зменшенню чутливості МП до індукторів її відкриття, тобто певною мірою відновлює проникність мітохондріальних мембран.

Дослідження впливу курсового введення мелатоніну на інтенсивність вільнорадикальних процесів, активність NO-синтаз та експресію м-РНК *bax* у серці старих шурів. Вивчали інтенсивність вільнорадикальних процесів за вмістом таких показників, як $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 і ДК – у гомогенаті та мітохондріях серця старих шурів до і після курсового введення їм мелатоніну. З'ясовано, що в серці як дорослих, так і старих тварин вміст $\cdot\text{O}_2^-$ у мітохондріях значно більший, ніж у гомогенаті міокарда, що свідчить про переважне мітохондріальне походження цього радикал-аніона. Однак у мітохондріях серця старих шурів вміст $\cdot\text{O}_2^-$ становить $137,2 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ білка} \pm 8,4 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ білка}$, що майже втричі перевищує такий у мітохондріях серця дорослих тварин ($47,1 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ білка} \pm 7,5 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ білка}$). Таким чином, мітохондрії є джерелом посиленої продукції $\cdot\text{O}_2^-$ у серці з віком тварин. Показано, що вміст H_2O_2 у гомогенаті та мітохондріях серця старих шурів приблизно однаковий і становить $23,75 \pm 3,93$ і $24,03 \text{ пмоль/мг білка} \pm 2,66 \text{ пмоль/мг білка}$ відповідно, що достовірно перевищує

вміст H_2O_2 у гомогенаті ($4,38$ пмоль/мг білка $\pm 0,5$ пмоль/мг білка) і мітохондріях серця дорослих щурів ($12,16$ пмоль/мг білка $\pm 1,6$ пмоль/мг білка). Показано, що вміст ДК у гомогенаті та мітохондріях дорослих щурів майже не відрізняється і становить $3,26$ нг/мг білка $\pm 0,49$ нг/мг білка і $3,6$ нг/мг білка $\pm 0,25$ нг/мг білка відповідно. Однак у гомогенаті ($17,71$ нг/мг білка $\pm 2,83$ нг/мг білка) і мітохондріях ($38,12$ нг/мг білка $\pm 2,55$ нг/мг білка) серця старих тварин вміст ДК достовірно підвищується, що свідчить про посилення процесів ПОЛ з віком. А з огляду на те, що цей показник у мітохондріях значно перевищує такий у гомогенаті, можна сказати, що і активність ПОЛ з віком особливо зростає саме в мітохондріях.

Таким чином, можна зробити висновок про залежну від віку інтенсифікацію в серці щурів вільнорадикальних процесів, в основному, внаслідок посилення генерації супероксидного радикалу та пероксиду водню, а також одного з проміжних продуктів ПОЛ – ДК – у мітохондріях серця старих щурів.

Курсове введення мелатоніну достовірно зменшувало вміст O_2^- у мітохондріях серця старих щурів ($57,0$ нмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка $\pm 6,8$ нмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка) порівняно з такими для тварин, яким не вводили мелатонін ($137,2$ нмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка; $P < 0,01$). Вміст H_2O_2 у мітохондріях серця старих щурів після курсового введення їм мелатоніну ($20,6$ пмоль/мг білка $\pm 1,4$ пмоль/мг білка) знижувався у порівнянні з таким для ста-

рих тварин (24 пмоль/мг білка $\pm 2,7$ пмоль/мг білка), однак це зменшення не було достовірним. Натомість після курсового введення старим щурам мелатоніну вміст ДК достовірно знижувався в мітохондріях серця і становив лише $13,75$ нг/мг білка $\pm 1,82$ нг/мг білка, в той час як для старих тварин, яким не вводили препарат, цей показник становив $38,2$ нг/мг білка $\pm 2,55$ нг/мг білка.

Слід відмітити, що активність iNOS незначним чином підвищується в мітохондріях серця старих щурів і становить $2,58$ нмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка $\pm 0,33$ нмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка у порівнянні з дорослими тваринами – $1,73$ нмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка $\pm 0,24$ нмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка (рис. 4). Водночас активність sNOS достовірно знижується в мітохондріях серця старих щурів у порівнянні з дорослими і становить $3,64 \pm 0,27$ і $1,84$ пмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка $\pm 0,26$ пмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка відповідно. Ймовірно, що пов'язане з

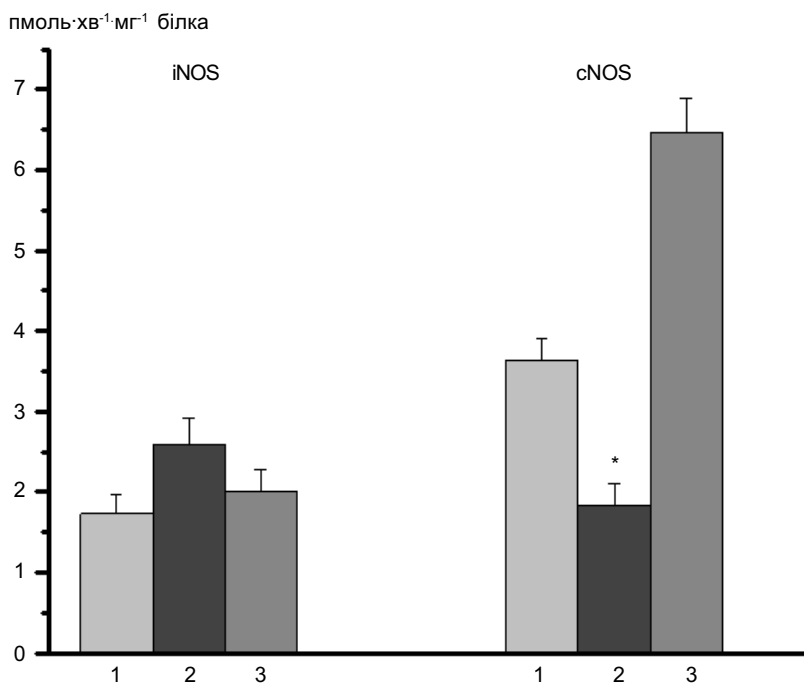


Рис.4. Активність NO-синтаз у мітохондріях серця щурів: 1 – дорослі щури (n=5); 2 – старі щури (n=5); 3 – старі щури після курсового введення їм мелатоніну (n=5). * тут і на рис.5 різниця порівняно з показником для дорослих тварин достовірна

віком збільшення чутливості МП до індукторів її відкривання частково відбувається, внаслідок зменшення вироблення NO мітохондріальною ізоформою NOS, яка, згідно з даними літератури, являє собою cNOS [10].

Показано, що зміни активності iNOS у мітохондріях серця старих щурів після курсового введення їм мелатоніну не носили достовірного характеру. В той час як активність cNOS значно зросла і становила $6,47 \text{ пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ білка} \pm 0,42 \text{ пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ білка}$ у порівнянні з цим показником для мітохондрій серця старих щурів, яким не вводили мелатонін – $1,84 \text{ пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ білка} \pm 0,26 \text{ пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ білка}$ (див. рис. 4). Це майже вдвічі перевищує значення активності cNOS у мітохондріях серця дорослих щурів.

Курсове введення мелатоніну також зменшувало базальний рівень експресії мРНК *bax* у серці старих щурів (рис. 5), яка, як було нами показано раніше [5], зростає з віком.

Згідно з даними літератури, зміна ішемічної толерантності з віком, що полягає у більш виражених змінах функціонального стану серця за умов його ішемії–реперфузії, пов'язана з розвитком мітохондріальної дисфункції [23], однак до цього часу їх не пов'язували з особливостями утворення

МП при старінні. Аналіз отриманих нами раніше експериментальних даних дає можливість зробити висновок про наявність підвищеної чутливості пороутворення в мітохондріях серця старих щурів до дії Ca^{2+} і окисників [5]. Зважаючи на те, що при старінні підвищується чутливість відкривання МП у печінці та лімфоцитах [27, 28, 30], стає очевидним, що цій властивості притаманне загальнофізіологічне значення при вікових змінах різних систем організму, відтак, процес зміни чутливості відкривання МП при старінні може носити генералізований характер.

У нашій роботі показано, що підвищення чутливості МП у серці з віком супроводжується інтенсифікацією в ньому вільнорадикальних процесів, в основному, внаслідок збільшення вмісту O_2^- і H_2O_2 у мітохондріях. Згідно з даними літератури, збільшення кількості вільних радикалів у мітохондріях призводить до того, що ці органели самі по собі стають мішенню токсичної дії підвищеного вмісту активних форм кисню [16], що може бути однією з причин підвищення їх чутливості до індукторів відкривання МП.

Нині вже достеменно відомо, що попередня перфузія ізольованого серця класичним інгібітором відкриття МП циклоспо-

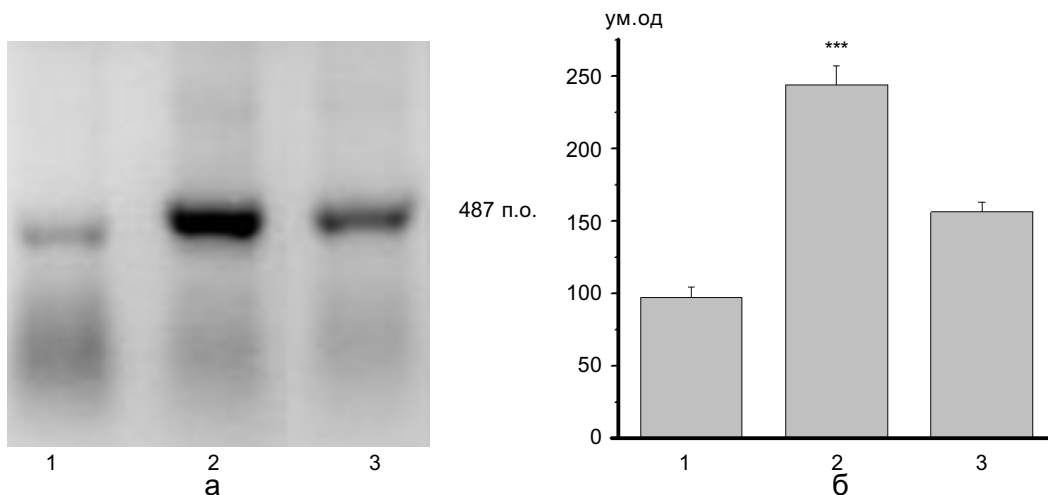


Рис.5. Експресія мРНК *bax* у серці щурів ($n=3$): 1 – дорослі щури; 2 – старі щури; 3 – старі щури після курсового введення їм мелатоніну (п.о. – пари основ)

рином А значно поліпшує відновлення функції серця за умов його ішемії та реперфузії [6, 18]. Це дозволило підтвердити участь МП у реперфузійних порушеннях серця. Однак роль мелатоніну як потенційного інгібітора відкривання МП в експериментах на ізольованому органі ще недостатньо досліджено. Для перевірки можливої інгібіторної дії мелатоніну щодо відкривання МП нами раніше були проведені досліди *in vitro* на ізольованих мітохондріях, в яких реєстрували відкривання МП в умовах моделювання оксидативного стресу за допомогою ФАО і тертбутилгідропероксиду (t-BuOOH). Установлений нами факт ефективного коригування МП-залежних проявів мітохондріальної дисфункції за умов дії ФАО і t-BuOOH за допомогою мелатоніну (подібно до дії циклоспорину А) без сумніву свідчить про можливість інгібування цієї речовиною відкривання МП за умов оксидативного стресу. Таким чином, доцільно певною мірою, використовувати мелатонін як інгібітор відкривання МП. Ці результати стали основою для досліджень з використанням парентерального введення мелатоніну *in vivo* з метою довготривалої корекції підвищеної чутливості відкривання МП у серці при старінні. Відомо, що курсове введення мелатоніну перорально (10 тиж) старим щурам призводило до значного зниження інтенсивності процесів ПОЛ, вмісту оксиду азоту та монооксиду вуглецю, на фоні загального підвищення вмісту АТФ і синтезу фосфатидилхоліну – показників, вміст яких значно збільшуються при старінні [11].

Отримані нами результати дозволяють стверджувати, що курсове введення мелатоніну виявляє загальну коригуючу дію щодо відновлення скоротливої функції серця при старінні. Це супроводжується відновленням чутливості мітохондрій серця старих щурів до індукторів відкривання МП до такої, яку спостерігали у дорослих тварин; зменшенням вмісту одного з факторів

підвищеної чутливості до індукторів відкривання МП при старінні – супероксидного радикала та ДК, а також зменшенням загального рівня експресії мРНК бах у серці та підвищенням активності ферменту cNOS у мітохондріях серця старих щурів після курсового введення їм мелатоніну. Ці результати підтверджують участь МП у розвитку змін функціонального стану серця старих щурів при його ішемії–реперфузії і нормалізації цього стану після курсового введення старим щурам мелатоніну. Зменшення експресії мРНК проапоптотичного агента бах у серці старих щурів після курсового введення їм мелатоніну, в той час як його експресія початково збільшена у порівнянні з дорослими тваринами насамперед є свідченням зменшення кількості апоптотичних клітин. Це також причина зниження числа тих клітин, що потенційно можуть вступити на шлях програмованої клітинної загибелі. Це в свою чергу сприяє покращенню перенесення серцем при старінні різних несприятливих факторів, одним з яких є ішемія–реперфузія. З іншого боку, розглядаючи бах як один із активаторів МП, який прямо може впливати на її відкривання [9], можна передбачити, що ймовірність відкривання МП, пов'язана з підвищенням її чутливості до індукторів, теж зводиться до мінімуму після курсового введення мелатоніну *in vivo* старим щурам.

ВИСНОВКИ

1. Установлено, що двотижневе курсове введення мелатоніну *in vivo* старим щурам сприяє відновленню функціонального стану серця та його реакції на ішемію–реперфузію.

2. Показано, що курсове введення мелатоніну старим щурам зменшує чутливість відкривання МП до Ca^{2+} і ФАО. Це супроводжується сповільненням вільнорадикальних процесів, підвищенням активності cNOS у мітохондріях, а також зменшенням експресії мРНК бах у серці.

**V.F. Sagach, O.V. Rudyk, G.L. Vavilova,
A.V. Kotsiuruba, Ju.P. Tkachenko**

MELATONIN RECOVERS ISCHEMIC TOLERANCE AND DECREASES THE SENSITIVITY OF MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING IN OLD RAT HEART

The effect of the hormone of pineal gland melatonin on the ischemic tolerance and the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening in old rat heart were studied. It has been shown in the Langendorf's isolated rat heart that heart contractile functional changes under ischemia and reperfusion were more pronounced in old (24-27 months) rat hearts in comparison with the adult (5-6 months) animals. A two-week's in vivo course of intraperitoneal injection of melatonin (1,5 mg/kg weight) to old rats contributed to the rehabilitation of the functional changes of isolated heart after ischemia during reperfusion and decreased the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening to Ca^{2+} and phenilarsinoxide in comparison with old animals which did not received melatonin. It was accompanied by the significant decreasing in mRNA bax expression in old rat heart, lessening in content of the superoxide radicals and dien conjugates and twice increasing in the activity of constitutive NO-synthase in heart mitochondria of old rat after a course of melatonin injection. The protective effect of melatonin on the mitochondrial permeability transition pore opening could be used for correction of the cardiac dysfunction with aging.

O. O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

O. V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара И.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лаб. дело. – 1988. – №2. – С.60–64.
2. Кветная Т.В., Князькин И.В. Мелатонин: роль и значение в возрастной патологии. – СПб.: ВМедА, 2003. – 93с.
3. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия // Биохимия. – 1985. – 50, №8. – С.1350–1361.
4. Костюк П.Г., Костюк О.П., Лук'янець О.О. Иони кальцію у функції мозку – від фізіології до патології. – К.: Наук. думка, 2005. – 198 с.
5. Сагач В.Ф., Вавилова Г.Л., Струтинська Н.А., Рудик О.В. Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори в серці шурів // Фізіол. журн. – 2004. – 50, №2. – С.49–63.
6. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // Там само. – 2003. – 49, №4. – С.6–12.
7. Ткаченко М.М., Сагач В.Ф., Коцюруба А.В. та ін. Ендотелій залежні скорочувальні реакції судинних гладеньких м'язів і вміст вільних радикалів кисню у шурів за умов старіння // Там само. – 2002. – 48, №4. – С.3–13.
8. Andrabi S.A., Sayeed I., Siemen D. et al. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin // FASEB J. – 2004. – 18, №7. – P.869–871.
9. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions // Mol. Immunol. – 2003. – 39, №11. – P.615–647.
10. Brookes P.S. Mitochondrial nitric oxide synthase // Mitochondrion – 2004. – 3, №4. – P.187–204.
11. Castillo C., Salazar V., Ariznavaretta C. et al. Effect of melatonin administration on parameters related to oxidative damage in hepatocytes isolated from old Wistar rats // J Pineal Res. – 2005. – 38, №4. – P.240–246.
12. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J. et al. Increased activity and expression of Ca^{2+} -dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // Amer. J. Physiol. – 1999. – 277, № 5(2). – P. F797–F804.
13. Conte D.S., Narindrasorasak S, Sarkar B. In vivo and in vitro iron-replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage // J. Biol. Chem. – 1996. – 271, №9. – P.5125–5130.
14. Duchon M.R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology // Mol. Aspects Med. – 2004. – 25, №4. – P.365–451.
15. Frolkis V.V., Frolkis R.A., Mkhitarian L.S., Fraifeld V.E. Age-dependent effects of ischemia and reperfusion on cardiac function and Ca^{2+} transport in myocardium // Gerontology. – 1991. – 37, №5. – P.233–239.
16. Green D. R., Kroemer G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? // J Clin. Invest. – 2005. – 115, №10. – P.2610–2617.
17. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – 126, №1. – P.131–138.
18. Halestrap A. P., Clarke S. J., Javadov S. A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection // Cardiovasc Res. – 2004. – 61, №3. – P.372–385.
19. Harman D. Free radical theory of aging // Triangle. – 1973. – 12, №4. – P.153–158.
20. Headrick J.P., Willems L., Ashton K.J. et al. Ischaemic tolerance in aged mouse myocardium: the role of adenosine and effects of A1 adenosine receptor overexpression // J. Physiol. – 2003. – 549, №3. – P.823–833.
21. Huwiler M., Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/ H_2O_2 /iodide system // Eur. J. Biochem. – 1984. – 141, №1. – P. 69–74.
22. Kuthan H., Ullrich V., Estabrook R.W. A quantitative

- test for superoxide radicals produced in biological systems // *Biochem. J.* – 1982. – **203**, №3. – P.551–558.
23. Lee I.M., Hsieh C.C., Paffenbarger R.S. Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Health Study // *JAMA.* – 1995. – **273**, №15. – P.1179–1184.
24. Lesnefsky E.J., Gallo D.S., Ye J. et al. Aging increases ischemia-reperfusion injury in the isolated, buffer-perfused heart // *J. Lab Clin. Med.* – 1994. – **124**, №6. – P.843–851.
25. Lesnefsky E.J., Hoppel C.L. Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – **420**, №2. – P.287–297.
26. Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, №1. – P.265–275.
27. Mather M.W., Rottenberg H. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2000. – **273**, №2. – P.603–608.
28. Mather M.W., Rottenberg H. The inhibition of calcium signaling in T lymphocytes from old mice results from enhanced activation of the mitochondrial permeability transition pore // *Mech. Ageing Dev.* – 2002. – **123**, №6. – P.707–724.
29. Moncada S.R., Palmer M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // *Pharmacol. Rev.* – 1991. – **43**, №2. – P.109–142.
30. Rottenberg H., Wu S. Mitochondrial dysfunction in lymphocytes from old mice: enhanced activation of the permeability transition // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1997. – **240**, №1. – P.68–74.
31. Shimizu S., Narita M, Tsujimoto M. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC // *Nature.* – 1999. – **399**, №6735. – P.483–487.
32. Vodovotz Y., Kwon N.S., Pospischil M. et al. Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-gamma and bacterial lipopolysaccharide // *J. Immunol.* – 1994. – **152**, №8. – P.4110–4118.
33. Zoratti M., Szabo I., De Marchi U. Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 2005. – **1706**, №1–2. – P.40–52.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 08.02.2005*