

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

## Зміни експресії генів UCP2 та UCP3, функціонального стану і кисневої вартості роботи міокарда в умовах старіння та ішемії–реперфузії

*В експериментах на перфузованих за Лангендорфом серцях дорослих (6 міс) і старих (24 міс) щурів, вивчали зміни функціонального стану серця і кисневу вартість його роботи під дією ішемії–реперфузії (20хв/40хв). Ступінь порушення проникності мітохондріальних мембран – утворення мітохондріальних пор – оцінювали за вивільненням в коронарне русло мітохондріального фактора ( $\lambda=250$  нм). У тих самих умовах за допомогою метода полімеразної ланцюгової реакції визначали рівень експресії генів UCP2 і UCP3. Мембранний потенціал і швидкість дихання мітохондрій вимірювали в суспензії мітохондрій серця дорослих і старих щурів. Показано, що погіршення функціонального стану серця старих щурів супроводжувалося збільшенням кисневої вартості його роботи і зниженням мембранного потенціалу мітохондрій, виділених з серця. Реперфузійні порушення кардіодинаміки, скоротливої активності міокарда і його кисневого обміну в ранній період реперфузії у старих щурів були менші порівняно з серцями дорослих. У серці старих щурів співвідношення мРНК UCP2 до мРНК контрольного гена GADPH (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази) було збільшене, а співвідношення мРНК UCP3/GADPH мало виражену тенденцію до зростання. Ішемія–реперфузія стимулювала експресію генів UCP2 і UCP3 в серці дорослих, але не старих тварин. Таким чином, в зміни функціонального стану серця і його реакцію на реперфузію при старінні робить внесок дисфункція мітохондрій, зумовлена підвищенням експресії генів UCP2 і UCP3.*

*Ключові слова: білки-роз'єднувачі UCP2 і UCP3, ізольоване серце, старіння, ішемія–реперфузія, мітохондріальна пора, мембранний потенціал мітохондрій.*

### ВСТУП

Білки-роз'єднувачі окисного фосфорилування (від англ. uncoupling proteins, UCP) – це група транспортних протеїнів, які вбудовані у внутрішню мембрану мітохондрій. Вони опосередковують явище протонного шунтування [29] та здатні впливати на мембранний потенціал мітохондрій. При цьому знижується синтез аденозинтрифосфату (АТФ), а енергія протонного градієнта розсіюється у вигляді тепла. Саме так працює UCP1, або білок термогенін, який експресується в тканинах бурого жиру та відповідає за процеси адаптивного термогенезу [11]. Але фізіологічна роль його гомологів UCP2 та UCP3, які експресуються в

тканинах серця, залишається нез'ясованою, в тому числі при окисному стресі, ішемії–реперфузії тощо. В клітині окисний стрес спостерігається при старінні, коли пошкоджуються комплекси дихального ланцюга [12], та легко відтворюється при ішемії–реперфузії [7], яка, крім того, модулює функції мітохондрій. На ранніх етапах реперфузії на внутрішній мембрані мітохондрій відкриваються неселективні мегаканали, або мітохондріальні пори (МП) [4, 16]. Утворення останніх призводить до набухання мітохондрій і збільшення протонної провідності внутрішньої мембрани, внаслідок чого відбувається дисипація мембранного потенціалу та роз'єднання

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

окисного фосфорилування. Проте роль UCP при цьому невідома. Виникає питання, які механізми переважають у процесі шунтування протонів і неефективної роботи дихального ланцюга у старих тварин – відкривання мітохондріальних пор чи підвищена активність UCP. Отже, UCP і мітохондріальні пори впливають на мембранний потенціал та процеси використання кисню мітохондріями та відповідно на функцію серця.

Метою цієї роботи було дослідити зміни експресії генів UCP2 та UCP3, функціонального стану та кисневої вартості роботи міокарда в умовах старіння та ішемії–реперфузії.

## МЕТОДИКА

Експерименти проводили на самцях щурів лінії Вістар віком 6 (n=7) та 24 міс (n=7). Серця вилучали за допомогою розчину грудної клітки та швидко поміщали в охолоджений (4°C) розчин Кребса–Хензелята. Перфузію коронарних судин здійснювали ретроградно в умовах постійного тиску (75–80 мм рт.ст.) при 37°C розчином такого складу (ммоль/л): NaCl – 118, KCl – 4,7, MgSO<sub>4</sub> – 1,2, NaHCO<sub>3</sub> – 24, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2, глюкоза – 10, CaCl<sub>2</sub> – 2,5. Перфузійний розчин безперервно аерували карбогеном (95 % O<sub>2</sub> і 5 % CO<sub>2</sub>). Тиск у порожнині лівого шлуночка (Рлш) та його першу похідну  $dP/dt_{max}$  і  $dP/dt_{min}$ , кінцевий діастолічний тиск (КДТ) вимірювали за допомогою латексного балончика, введеного в порожнину лівого шлуночка та з'єднаного з тензодатчиком 746 („Мінгограф-82”, „Елєта”, Швеція). Коронарний потік вимірювали як об'єм перфузійного розчину, що проходив через серце за хвилину.

Для розрахунку споживання кисню міокардом реєстрували напруження кисню у пробах розчину, що притікав і відтікав від серця, за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk-2 („Radiometer”, Данія). Кисневу вартість роботи серця виражали як спів-

відношення споживання кисню до інтенсивності скорочувальної функції серця – ІСФ (добуток тиску, який розвивав лівий шлуночок, на частоту серцевих скорочень).

Моделювання ішемії–реперфузії здійснювали за допомогою повного припинення перфузії коронарних судин протягом 20 хв. Під час ішемії температуру сердець підтримували, занурюючи їх у перфузійний розчин (37°C). Зміни досліджуваних показників реєстрували протягом 40 хв після відновлення перфузії.

Реєстрацію мітохондріального фактора проводили в пробах відтікаючого від серця розчину, як описано нами раніше [4]. Проби збирали до ішемії та в першу хвилину реперфузії. Оптичну густину проб вимірювали в ультрафіолетовому спектрі в діапазоні довжини хвиль 230–260 нм за допомогою спектрофотометра СФ-46. Для кількісної характеристики мітохондріального фактора розраховували значення оптичного поглинання перфузійного розчину ( $\lambda=245\text{--}250$  нм) як різницю між найвищим показником екстинції розчину, взятим до та після ішемії.

Мітохондрії з тканин серця виділяли за допомогою диференціального ультрацентрифугування [1]. Серця ретельно промивали охолодженим розчином 0,9 % KCl (2–4°C), подрібнювали та гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСl – 25, ЕДТА – 1; рН 7,2–7,4. Гомогенат центрифугували при 700 g 8 хв (4°C). Супернатант центрифугували повторно при 11000 g 16 хв (4°C). Отриманий осад (мітохондріальна фракція) суспендували в буфері (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСl – 25; рН 7,2–7,4, і одразу використовували в дослідях. Концентрацію білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [20].

Мембранний потенціал мітохондрій вимірювали методом Бранда [9, 22]. Мітохондрії інкубували в середовищі, що містило (ммоль/л): KCl – 120, тріс-НСl – 25,

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3, 5 % знежиреного БСА, рН 7,2–7,4. У герметичну термостатовану камеру (37°C), обладнану МТР<sup>+</sup>-селективним електродом вносили мітохондрії з розрахунку 0,5 мг/мл білка. Роботу першого комплексу дихального ланцюга блокували ротеноном ( $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л), а роботу АТФ-синтази – олігоміцином ( $10^{-7}$  моль/л). Для ініціації дихання вносили сукцинат Na (5 ммоль/л). Поглинання кисню суспензією мітохондрій реєстрували за допомогою електрода Кларка та газоаналізатора BMS 3 Mk-2 Radiometer.

Значення мембранного потенціалу мітохондрій ( $\Delta\phi_m$ ) розраховували за рівнянням Нернста, приймаючи величину внутрішнього об'єму мітохондрій за 0,65 мкл/мг білка [8].

Експресію генів UCP2 та UCP3 вивчали в зразках тканин серця. До 1-ї і 2-ї груп увійшли інтактні тварини (n=5) віком 6 міс і 24 міс відповідно; 3-тю і 4-ту групи склали тварини віком 6 і 24 міс (n=6), яким здійснювали ішемію–реперфузію. Серця тварин 1-ї і 2-ї груп перфузували протягом години без жодних впливів. Тривалість ішемії становили 20 хв, реперфузії – 40 хв. Верхівку серця щурів відрізували та одразу використовували для виділення РНК за допомогою реактиву TRIZOL (“Sigma”, США). Зворотну транскрипцію проводили за допомогою набору RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва), використовуючи 300–600 нг тотальної РНК і випадковий гексамерний праймер. Отриману одноланцюгову ДНК використовували для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для ампліфікації фрагментів генів UCP2 та UCP3 [31], а також фрагмента гена GADPH (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа), який приймали за внутрішній контроль. Послідовність нуклеотидів у праймерах: прямий – 5'-TCATCAAAGATACTCTCCTGAAAGC-3', зворотний – 5'-TGACGGTGGTGCAGAAGC-3' для гена UCP2; прямий – 5'-GTGACSTATGA

CATCATCAAGGA-3', зворотний – 5'-GCTCCAAAGGCAGAGACAAAG-3' для гена UCP3; прямий – 5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAATATGA-3', зворотний – AGCACCAGTGGATGCAGGGGATGAT-3' для гена GADPH. Суміш для ампліфікації містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 1,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 30 пмоль/л кожного з праймерів (“Metabion“, Німеччина), 0,5 ОД Таq-полімерази (“Амплиценс”, Росія) і ДНК-матрицю, отриману в результаті зворотної транскрипції. Об'єм проби доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері “GeneAmp System 2700” (“Applied Biosystems”, США). Ампліфікація фрагментів указаних генів складалася з 35 циклів: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – 58°C (1 хв) і елонгація – 72°C (1 хв). Візуалізацію та оцінку яскравості ампліфікатів після горизонтального електрофорезу (150 В протягом 30 хв) в 1,5%-му агарозному гелі з бромідом етидію, проводили за допомогою транслюмінатора та програмного забезпечення ViTan (“Биоком”, Росія). Розраховували відношення мРНК генів UCP до мРНК гена GADPH.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою Microsoft Excel з використанням методу різниць. Всі дані виражалися у вигляді середнього  $\pm$  стандартне відхилення. Достовірність змін показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Функціональний стан і киснева вартість роботи серця у дорослих і старих щурів.* Результати експериментів свідчать, що з віком функціональний стан серця щурів змінюється (рис. 1): рівень тиску, який розвивав лівий шлуночок, у старих щурів був достовірно вищий і становив  $154 \pm 5$  порівняно зі  $129$  мм рт. ст.  $\pm 8$  мм рт. ст. у

дорослих тварин ( $P < 0,02$ ). Це супроводжувалося вповільненням процесів розслаблення міокарда ( $dP/dt_{\min}$  становила  $1979 \pm 31$  порівняно з  $2527$  мм рт.ст./с  $\pm 170$  мм рт.ст./с у дорослих щурів;  $P < 0,01$ ), зменшенням частоти серцевих скорочень (з  $220 \pm 18$  у дорослих до  $190$  хв $^{-1} \pm 24$  хв $^{-1}$  у старих тварин). Водночас інтенсивність скоротливої функції міокарда (добуток тиску, що розвивав лівий шлуночок та частоти серцевих скорочень), що відображає роботу серця в умовах нашого експерименту, практично не відрізнялася, а споживання кисню міокардом старих тварин при цьому підвищувалося майже на 30 % ( $P < 0,03$ ). Це вказує на збільшену потребу тканин серця старих тварин у кисні або неефективне його використання. Таким чином, киснева вартість роботи серця 24-місячних щурів

була достовірно більшою (див. рис. 1, г), ніж у 6-місячних ( $P < 0,05$ ). Отже, збільшення кисневої вартості роботи серця старих щурів могло свідчити про порушення роботи дихального ланцюга мітохондрій та роз'єднання окисного фосфорилювання.

Зміни рівня мембранного потенціалу у суспензії мітохондрій серця дорослих та старих щурів. Для перевірки цього припущення, реєстрували значення мембранного потенціалу та одночасно швидкість дихання у суспензії мітохондрій серця дорослих і старих щурів. Виявлено, що в умовах максимальної швидкості поглинання кисню мембранний потенціал мітохондрій серця старих щурів становив  $-146,5$  мВ  $\pm 3,2$  мВ і був достовірно нижчий, ніж у суспензії мітохондрій, ізольованих з сердець дорослих

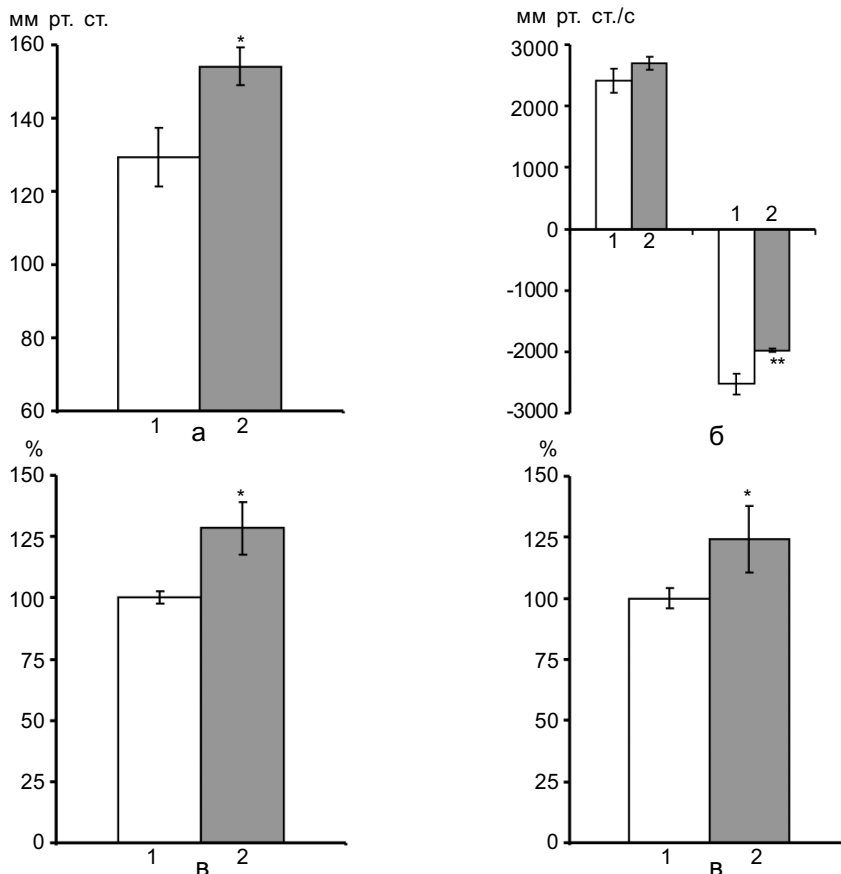


Рис. 1. Вікові зміни функціонального стану серця у дорослих (1) і старих щурів (2): а – тиск у лівому шлуночку; б – швидкість скорочення ( $dP/dt_{\max}$ ) і розслаблення міокарда ( $dP/dt_{\min}$ ); в – споживання кисню міокардом; г – киснева вартість роботи серця. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$

тварин ( $\Delta\Phi_m = -156,5 \text{ мВ} \pm 3,5 \text{ мВ}$ ;  $P < 0,05$ ). Це узгоджується з даними літератури [26, 27, 28].

Таким чином, зниження мембранного потенціалу мітохондрій серцець 24-місячних щурів може свідчити про наявність шунту протонів та ендогенне роз'єднання окисного фосфорилування, і тим самим пояснити збільшене споживання кисню ізольованим серцем старих тварин, що спостерігалось у наших експериментах (див. рис. 1, в).

Відомо, що при реперфузії ішемізованого серця спостерігається утворення мітохондріальних пор, оскільки в цих умовах є поєднання вирішальних чинників їх активації – надмірної продукції вільних радикалів, високого вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  та низького АТФ [14]. Саме модель ішемії–реперфузії

ми використовували для дослідження причин збільшення кисневої вартості роботи серця старих тварин.

*Функціональний стан, киснева вартість роботи міокарда та вивільнення мітохондріального фактора у дорослих і старих щурів при ішемії–реперфузії.* Показано, що тотальна ішемія ізольованого серця та наступна його реперфузія як у дорослих, так і старих тварин призводили до розвитку значних змін показників кардіодинаміки та скоротливої активності міокарда (рис.2). При зіставленні ступеня реперфузійних порушень функції серця двох груп тварин виявилось, що до 10-ї хвилини реперфузії відновлення досліджуваних показників у старих щурів було більш суттєвим, ніж у дорослих (див. рис. 2, б), а на 40-й хвилині

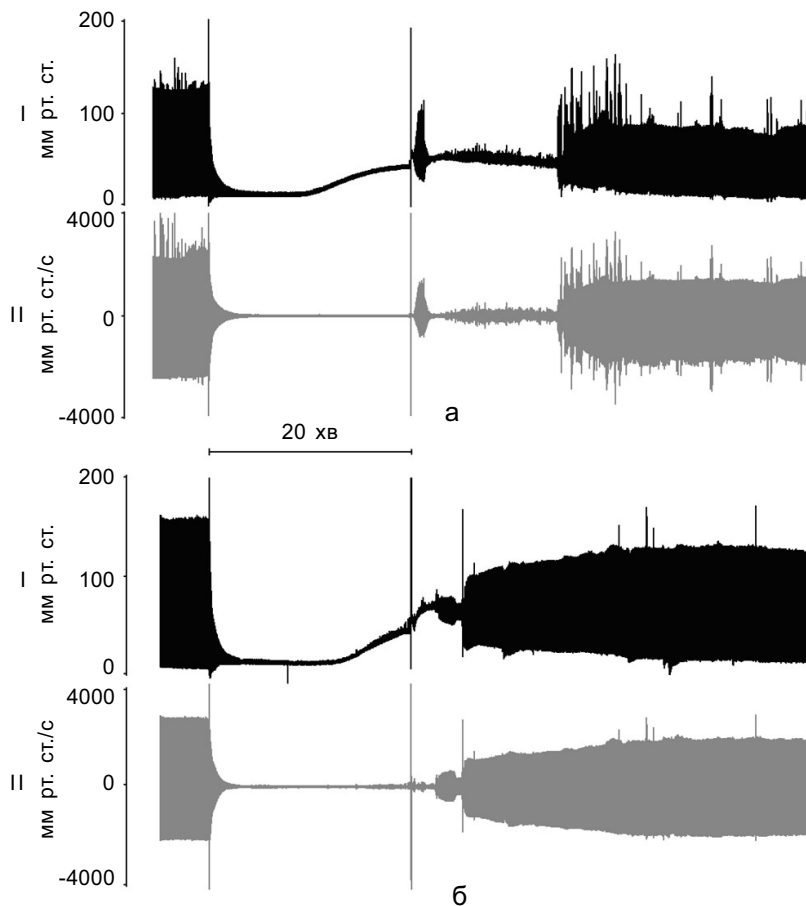


Рис. 2. Вплив ішемії–реперфузії на зміни тиску та скоротливої активності серця у дорослих (а) та старих (б) щурів: I – тиск, що розвивав лівий шлуночок; II – швидкість скорочення та розслаблення міокарда (dP/dt)

спостереження вони були вже практично однакові. Важливо відзначити, що динаміка кисневих показників роботи серця корелювала зі змінами його функціонального стану: як на 10-й, так і на 40-й хвилині після відновлення потоку киснева вартість роботи серця у старих тварин збільшувалася менше порівняно з дорослими ( $116 \pm 11$  щодо  $153 \% \pm 13 \%$  у дорослих щурів) при більш високому її вихідному значенні у 24-місячних щурів. Однак на 40-й хвилині реперфузії номінальні значення цього показника вірогідно не відрізнялися у двох груп тварин.

Таким чином, у 24-місячних щурів реперфузійні порушення кардіодинаміки та скоротливої активності міокарда у ранній період були меншими порівняно з 6-місячними, отже, вони легше переносили ішемічне навантаження. Ймовірно, у старих щурів погіршений вихідний функціональний стан серця у цілому є поштовхом для запуску таких шляхів обміну, які сприяють мобілізації захисних механізмів і дають змогу міокарду скоріше та з найменшими втратами подолати ішемію–реперфузію. Однією з таких можливостей може бути підвищена „фонова” активність індукбельної NO-синтази (iNOS) [3]. Відомо [30], що у трансгенних мишей з підвищеною експресією iNOS ізольовані серця скоріше відновлювали скорочувальну активність після ішемії, при цьому зменшувався і розмір інфаркта. Кардіопротекторну дію пов'язують зі зниженням індукції вільних радикалів та утворення мітохондріальних пор.

Як показано нами раніше [4, 23] в експериментах на ізольованому серці, ступінь порушення проникності мітохондріальних мембран можна оцінювати за вивільненням у коронарне русло мітохондріального фактора ( $\lambda=250$  нм). Результати спектрофотометричних вимірювань показали, що на першій хвилині реперфузії у старих тварин порівняно з дорослими більш

суттєво підвищується оптична густина відтікаючого від серця розчину (рис. 3). Різниця оптичного поглинання розчинів при  $\lambda=250$  нм у групі дорослих тварин становила  $0,638$  ум.од.  $\pm 0,039$  ум.од., що достовірно нижче за значення у групі старих щурів ( $0,969$  ум.од.  $\pm 0,032$  ум.од.;  $P<0,001$ ). Останнє свідчило про активне утворення мітохондріальних пор при реперфузії та підтверджує дані [2] про підвищену чутливість до індукторів їх відкриття у старих тварин.

Таким чином, ми вважаємо, що зменшення реперфузійних порушень функції серця у старих щурів порівняно з дорослими не пов'язано зі зниженням утворення мітохондріальних пор, а зумовлено іншими механізмами.

*Зміни експресії мРНК генів UCP2 та UCP3 при ішемії–реперфузії серця у дорослих і старих щурів.* За допомогою

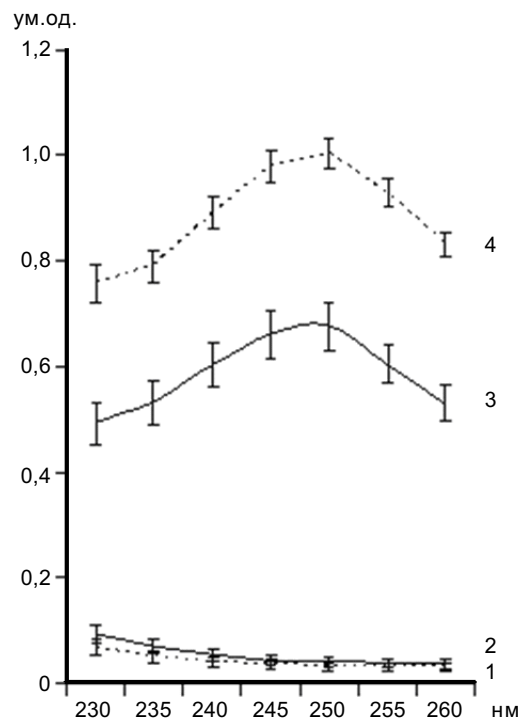


Рис. 3. Зміни оптичної щільності розчину, що відтікав від ізольованого серця щурів перед ішемією (1, 2) та за першу хвилину реперфузії (3, 4): суцільна лінія – дорослі, пунктир – старі тварини

ПЛР було встановлено, що у серці 24-місячних щурів порівняно з 6-місячними достовірно збільшувалося співвідношення мРНК UCP2 до GADPH на 39 %, а співвідношення мРНК UCP3 до GADPH мало виражену тенденцію до зростання (рис. 4).

У серцях дорослих тварин на 40-й хвилині відновлення перфузії коронарних судин після дії 20 хв тотальної ішемії співвідношення мРНК генів UCP2/GADPH та UCP3/GADPH достовірно збільшувалося порівняно з вихідним рівнем їх експресії на 27 та 32 % відповідно (рис. 5). За аналогічних умов у старих тварин змін експресії не відмічалось, тобто високий рівень експресії генів UCP, який спостерігався в вихідному стані, зберігався і після ішемії протягом 40 хвилин реперфузії (табл. 1).

Вивчені нами показники кардіодинаміки вказують на розлад скоротливої функції серця з віком і збільшення кисневої вартості його роботи, що є наслідком порушення

роботи електронтранспортного ланцюга. Останнє підтверджується результатами про зниження мембранного потенціалу мітохондрій серця у старих тварин і свідчить про витік протонів і роз'єднання окисного фосфорилування.

У нашому дослідженні ми спробували протестувати дві білкові системи, які розсіюють протонний градієнт – мітохондріальні пори та UCP. Відомо і про інші шляхи дисипації протонного градієнта: трансмембранне перенесення протонів неестерифікованими жирними кислотами, які при цьому виступають роз'єднувачами, та протонпровідна активність аденіннуклеотидтранслокази внаслідок алостеричної стимуляції за допомогою аденіннуклеотидмонофосфату [22]. Але всі чотири запропоновані шляхи перекриваються між собою, оскільки аденіннуклеотидтранслоказа є складовою мітохондріальної пори, а жирні кислоти – активаторами UCP [15].

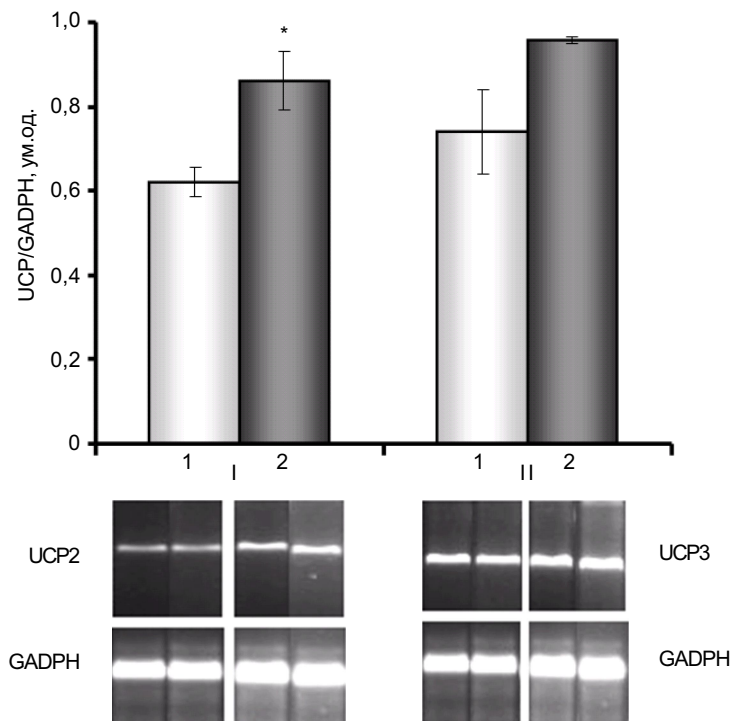


Рис. 4. Вплив віку на рівень мРНК генів UCP2 і UCP3 у тканинах серця 6-місячних (1) і 24-місячних (2) щурів: I – UCP2/GADPH, II – UCP3/GADPH. Під кожним стовпчиком показані відповідні смуги електрофореграм

## Відношення мРНК генів UCP2/GADPH та UCP3/GADPH (ум. од.) у дорослих і старих щурів у контролі та при ішемії–реперфузії серця (M±m)

| Група тварин                             | UCP2/GADPH    | UCP3/GADPH    |
|--|---------------|---------------|
| Інтактні щури                            |               |               |
| 6 міс                                    | 0,620 ± 0,034 | 0,740 ± 0,1   |
| 24 міс                                   | 0,862 ± 0,07* | 0,957 ± 0,006 |
| Щури, яким здійснювали ішемію–реперфузію |               |               |
| 6 міс                                    | 0,790 ± 0,06* | 0,983 ± 0,01* |
| 24 міс                                   | 0,813 ± 0,071 | 0,995 ± 0,008 |

\* P<0,05 відносно інтактних щурів віком 6 міс.

Підвищена експресія генів UCP2 і UCP3 у старих щурів, яку ми зареєстрували у наших дослідженнях, дає змогу вважати, що при старінні організму у ендогенний механізм збільшення протонної проникності мітохондріальних мембран залучені UCP. На користь цього свідчить загальновідомий факт про підвищення з віком концентрації жирних кислот у плазмі [5] та наявність даних про кореляцію між рівнем UCP2 і UCP3 у серці та вмістом жирних кислот у

плазмі [21]. Активація з віком UCP пояснює збільшене споживання кисню міокардом старих тварин та знижений за нашими результатами мембранний потенціал мітохондрій серця, а також мозку [27], печінки [26] і нирок [28]. У старих тварин за вихідних умов ми не зареєстрували у відтікаючому від серця розчині мітохондріального фактора, який відігравав для нас роль маркера відкриття мітохондріальних пор в експериментах *in situ*, але дані

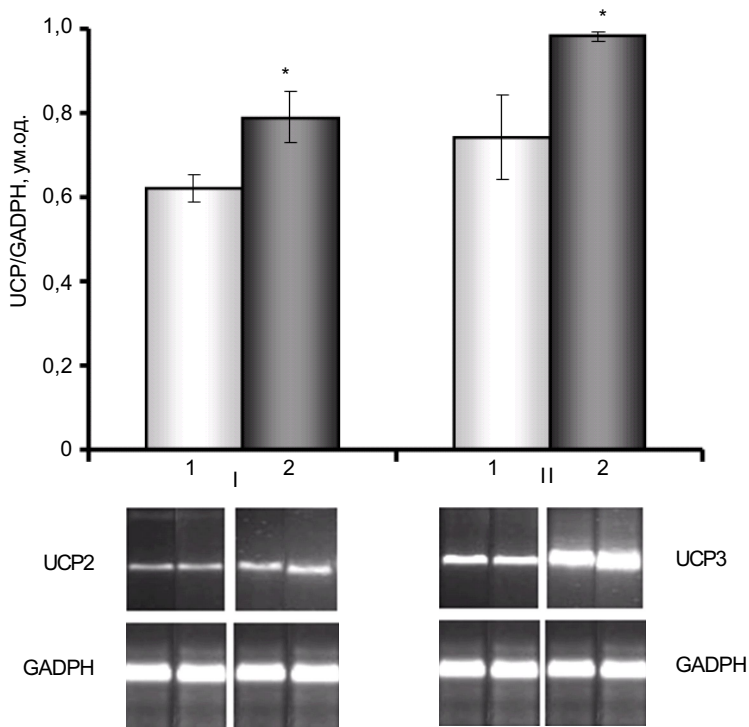


Рис. 5. Експресія генів UCP2 (I) та UCP3 (II) у 6-місячних щурів до (1) і після ішемії–реперфузії (2)



про підвищення у цитозолі кардіоміоцитів цитохрому С та зниження Bcl-2 – антиапоптотичного білка [24] у 16- та 24-місячних щурів свідчать про можливість транзиторного відкривання мітохондріальних пор у старих тварин. Є свідчення збільшення чутливості ізольованих мітохондрій старих тварин до іонів кальцію [2], тобто для порозалежного набухання мітохондрій серця старих тварин необхідна менша кількість кальцію, ніж для мітохондрій дорослих щурів. Таким чином, з віком імовірно задіяні обидва механізми витоку протонів мітохондріальних мембран кардіоміоцитів – активізація UCP та утворення мітохондріальних пор.

За результатами наших досліджень у 24-місячних щурів рівень експресії генів UCP під впливом ішемії–реперфузії не змінювався порівняно з 6-місячними щурами, а залишався таким же високим, як і до ішемії, а рівень мітохондріального фактора з початком реперфузії суттєво зростав. Отже, ми вважаємо, що реперфузійні порушення функції серця старих тварин, як і дорослих, у першу чергу, пов'язані зі зміною проникності мітохондріальної мембрани кардіоміоцитів внаслідок утворення мітохондріальних пор [13, 16, 18, 19]. При цьому мембранний потенціал мітохондрій ішемізованих кардіоміоцитів стрімко знижується [25]. Нами вперше показано, що порушення функціональної активності міокарда 24-місячних тварин при активації мітохондріальних пор ішемією–реперфузією супроводжувалося вивільненням значно більшої кількості речовин та мітохондріального фактора, ніж у 6-місячних тварин. Якщо процес утворення мітохондріальних пор у старих тварин при реперфузії серця полегшується внаслідок зниження порога чутливості мітохондрій до  $Ca^{2+}$ , то ймовірно і навантаження клітин іонами кальцію буде менше. Можна припустити, що саме тому реперфузійні зміни функціонального стану серця старих щурів у наших експериментах були не

такими значними, як у дорослих. У останніх ішемія–реперфузія мала стимулювальний ефект і на експресію генів UCP2 та UCP3, що характеризується збільшеною кількістю транскриптів цих генів у тканинах серця. Наші результати узгоджуються з даними Murray і співавт. [21] – у дорослих щурів спостерігається збільшення експресії білка UCP3 у відповідь на тривалу коронарооклюзію. Отже, у дорослих тварин при реперфузії запускаються обидва механізми, що знижують мембранний потенціал мітохондрій – активація UCP і утворення мітохондріальних пор. Ми припускаємо, що запуск клітиною експресії генів UCP в умовах ішемії мав захисний характер, оскільки вже відомо, що активація UCP призводить до зменшення продукції вільних радикалів [10]. Саме тому, імовірно, явно підвищений рівень експресії UCP у старих щурів призводив до мобілізації таких клітинних механізмів, що протидіяли окисному стресу та мали протективний ефект на функціональний стан серця при ішемії–реперфузії. Аналіз отриманих результатів дає змогу нам зробити припущення, що активація UCP має для клітини насамперед захисний характер за типом „запобіжного клапана” перед загрозливими порушеннями обміну, що виникають внаслідок розвитку глибокого окисного стресу.

## ВИСНОВКИ

1. Пригнічення функціонального стану серця старих щурів супроводжувалося збільшенням кисневої вартості його роботи та зниженням мембранного потенціалу мітохондрій кардіоміоцитів.

2. Реперфузійні порушення кардіодинаміки та скоротливої активності міокарда у ранній період реперфузії у старих щурів були меншими порівняно з дорослими.

3. У серці старих щурів співвідношення мРНК UCP2/GADPH було підвищеним, а UCP3/GADPH – мало виражену тенденцію до підвищення порівняно з дорослими.

4. У серцях дорослих тварин на 40-й хвилині відновлення перфузії коронарних судин після 20-хвилинної тотальної ішемії рівень транскриптів генів UCP2 та UCP3 достовірно збільшувався порівняно з вихідним рівнем їх експресії. За аналогічних умов у старих тварин змін експресії не відмічалось.

**Ю.В. Гошовская, О.О. Лисовой,  
Т.В. Шиманская, В.Ф. Сагач**

#### **ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ UCP2 ТА UCP3, ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ И КИСЛОРОДНОЙ СТОИМОСТИ РАБОТЫ МИОКАРДА В УСЛОВИЯХ СТАРЕНИЯ И ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ**

В экспериментах на изолированных сердцах взрослых (6 мес) и старых (24 мес) крыс, перфузируемых по Лангендорфу, изучали изменения функционального состояния сердца и кислородную стоимость его работы под действием ишемии-реперфузии (20мин/40мин). Оценивали степень нарушения проницаемости митохондриальных мембран – образование митохондриальных пор – по высвобождению в коронарное русло митохондриального фактора ( $\lambda=250$  нм). В тех же условиях методом полимеразной цепной реакции определяли уровень экспрессии генов UCP2 и UCP3. Регистрировали значение мембранного потенциала и скорость дыхания в суспензии митохондрий сердца взрослых и старых крыс. Показано, что ухудшение функционального состояния сердца старых крыс сопровождалось увеличением кислородной стоимости его работы и снижением мембранного потенциала митохондрий, выделенных из сердца. Реперфузионные нарушения кардиодинамики, сократительной активности миокарда и его кислородного обмена в ранний период реперфузии у старых крыс были менее выражены по сравнению со взрослыми. В сердце старых крыс соотношение мРНК UCP2 к мРНК контрольного гена GADPH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) был увеличенным, а соотношение мРНК UCP3/GADPH имело выраженную тенденцию к повышению. Ишемия-реперфузия стимулировала экспрессию генов UCP2 и UCP3 в сердце взрослых, но не старых животных сравнительно с их исходным уровнем. Сделан вывод, что при старении организма в изменения функционального состояния сердца и его реакции на реперфузию вносит вклад дисфункция митохондрий, обусловленная повышением экспрессии белков-разобщителей окислительного фосфорилирования.

Ключевые слова: белки-разобщители UCP2 и UCP3, изолированное сердце, старение, ишемия – реперфузия, митохондриальная пора, мембранный потенциал митохондрий.

**Goshovska Y.V., Lisovyi O.O., Shimanskaya T.V.,  
Sagach V. F.**

#### **UCP2 AND UCP3 GENES EXPRESSION, HEART FUNCTION AND OXYGEN COST OF MYOCARDIAL WORK CHANGES DURING AGING AND ISCHEMIA-REPERFUSION**

To examine the effects of ischemia/reperfusion on UCPs genes expression, heart function and oxygen cost of myocardial work, hearts of adult (6 mo) and old (24 mo) rats were perfused by Langendorf preparation and subjected to 20 min ischemia followed by 40 min reperfusion. Mitochondrial permeability transition due to ischemic stimuli was evaluated by release of mitochondrial factor ( $\lambda=250$  nm) which was previously shown as a marker of MPTP opening. Expression of UCPs was detected by reverse transcriptional polymerase chain reaction. Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Phi_m$ ) and oxygen consumption in isolated heart mitochondria of adult and old rats were measured. It was shown that impaired function of aging rat hearts was accompanied with an increased oxygen cost of myocardial work and lower mitochondrial membrane potential compared with adult rats. Reperfusion disturbances of cardiodynamic, contractile activity of myocardium and noneffective oxygen utilization in early period of reperfusion were less intensive in aged hearts than in adult ones. Therefore, the levels of mRNA of UCP2 in aging hearts were higher and mRNA levels of UCP3 were tended to increase. At the same time ischemia/reperfusion increased the expression of UCP2 and UCP3 in adult myocardium: mRNA levels of UCPs were significantly higher than those in control, whereas there was no such effect in aging hearts. It is concluded that uncoupling proteins are implicated in the age-depended heart dysfunction and development of the pathological mechanisms during ischemia-reperfusion.

Key words: uncoupling proteins UCP2 and UCP3, isolated heart, aging, ischemia – reperfusion, mitochondrial permeability transition pore, mitochondrial membrane potential.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National  
Academy Sciences of Ukraine, Kyiv*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. 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.
2. Сагач В.Ф., Вавілова 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.
3. Сагач В.Ф., Рудик О.В., Вавілова Г.Л. та ін. Мелатонін відновлює ішемічну толерантність і зменшує чутливість відкривання мітохондріальної пори в серці старих шурів // Фізіол. журн. – 2006. – **52**, №3. – С. 3–14.
4. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор,

- який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // *Фізіол. журн.* – 2003. – **49**, №4. – С. 6–12.
5. Терешина Е.В. Роль жирних кислот в розвитку возрастного окислителного стресса. Гипотеза // *Успехи геронтології.* – 2007. – **20**, №1. – С. 59–65.
  6. Barazzoni R., Nair K.S. Changes in uncoupling protein-2 and -3 expression in aging rat skeletal muscle, liver, and heart // *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2001. – **280**. – P. E413–E419.
  7. Becker L.B., Vanden Hoek T.L., Shao Z-H. et al. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **277**. – P2240–2246.
  8. Borutaite V., Mildaziene V., Brown G.C., Brand M.D. Control and kinetic analysis of ischemia-damaged heart mitochondria: which parts of the oxidative phosphorylation system are affected by ischemia? // *Biochim. Biophys. Acta* – 1995. – **1272**. – P. 154–158.
  9. Brand M.D. Measurement of mitochondrial proton-motive force /Editors: Brown G.C., Cooper C.E. – In: *Bioenergetics: a practical approach.* – Oxford.: IRL Press. – 1995. – P. 39–62.
  10. Brand M.D., Esteves T. Physiological function of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3 // *Cell Met.* – 2005. – **2**. – P. 85–93.
  11. Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance // *Physiol. Rev.* – 2004. – **84**. – P. 277–359.
  12. Choksi K.B., Papaconstantinou J. Age-related alterations in oxidatively damaged proteins of mouse heart mitochondrial electron transport chain complexes // *Free Rad. Biol. Med.* – 2008. – **44**. – P. 1795–1805.
  13. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // *Biochem. J.* – 1999. – **341**. – P. 233–249.
  14. Crompton M., Barksby E., Johnson N., Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death // *Biochimie.* – 2002. – **84**. – P. 143–152.
  15. Esteves T.C., Brand M.D. The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3 // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – **1709**. – P. 35–44.
  16. Griffiths E., Halestrap A. Mitochondrial non specific pores remain closed during cardiac ischaemia but open upon reperfusion // *Biochem. J.* – 1995. – **307**. – P. 93–98.
  17. Halestrap A., Mcstay G., Clarke S. The permeability transition pore complex: another view // *Biochemie.* – 2002. – **84**. – P. 153 – 166.
  18. Hausenloy D.J., Maddock H.L., Baxter G.F., Yellon D.M. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial precondition? // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – **55**. – P. 534–543.
  19. Hausenloy D., Yellon D.M. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischemia and reperfusion // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2003. – **35**. – P. 339–341.
  20. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with the Folling phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, № 1. – P. 265–275.
  21. Murray A.J., Cole M.A., Lygate C.A. et al. Increased mitochondrial uncoupling proteins, respiratory uncoupling and decreased efficiency in the chronically infarcted rat heart // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2008. – **44**. – P. 694–700.
  22. Nadochiy S.M., Tompkins A., Brookes P.S. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischemia/reperfusion injury and precondition: implications for pathology and cardioprotection // *Biochem. J.* – 2006. – **395**. – P. 611–618.
  23. Nadochiy S.M., Nauduri D., Shimanskaya T.V. et al. Purine release: a protective signaling mechanism of the mitochondrial permeability transition pore in ischemia // *Фізіол. журн.* – 2008. – **54**, №6. – С. 5–14.
  24. Phaneuf S., Leeuwenburgh C. Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age // *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2002. – **282**. – P. R423–R430.
  25. Sack M.N. Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – **72**. – P. 210 – 219.
  26. Sastre J., Millan A., Garcia dIA. et al. Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress // *Free Rad. Biol. Med.* – 1998. – **24**. – P. 298–304.
  27. Sen T., Sen N., Jana S. et al. Depolarization and cardiolipin depletion in aged rat brain mitochondria: relationship with oxidative stress and electron transport chain activity // *Neurochem. Int.* – 2007. – **50**. – P. 719–725.
  28. Serviddio G., Romano A.D., Tamborra R. et al. Bioenergetics in aging: mitochondrial proton leak in aging rat liver, kidney and heart // *Redox. Rep.* – 2007. – **12**, № 1. – P. 91–95.
  29. Stuart J.A., Brindle K.M., Harper J.A., Brand M.D. Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1999. – **31**, №5. – P. 517–525.
  30. West M.B., Rokosh G., Obal D. et al. Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia/reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition // *Circulation.* – 2008. – **118**. – P. 1970–1978.
  31. Young M.E., Patil S., Ying J. et al. Uncoupling protein 3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor (alpha) in the adult rodent heart // *FASEB J.* – 2001. – **15**, №3. – P. 833–45.