

Н.А. Струтинська, С.В. Тимошук, Г.Л. Вавілова, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач

## Експресія UCP3 і чутливість мітохондріальної пори до індуктора $\text{Ca}^{2+}$ у серці старих щурів за умов активації біосинтезу коензиму Q

Досліджували експресію мітохондріального роз'єднувального білка 3 (UCP3) і чутливість мітохондріальної пори (МП) до дії її природного індуктора –  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л) у серці старих щурів в умовах активації *in vivo* синтезу убіхінону – коферменту Q, (CoQ) за допомогою введення тваринам його попередників (параоксibenзойної кислоти, амінокислоти метіоніну та модулятора вітаміну E). Показано зменшення на 63 % рівня експресії UCP3 у старих щурів порівняно з дорослими у разі підвищеної чутливості МП при кальцієвому навантаженні в серці старих тварин. В умовах активації ендогенного синтезу CoQ практично повністю відновлювався рівень експресії UCP3 у серці старих щурів у порівнянні з дорослими. При цьому знижувався ступінь чутливості МП до кальцію як індуктора її відкриття в серці старих щурів. Спостерігали підвищений вміст у мітохондріях серця старих щурів супероксидного ( $\text{O}_2^-$ ) і гідроксильного (OH) радикалів, а також стабільного метаболіту активного кисню перекису водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) у порівнянні з дорослими тваринами. В умовах активації ендогенного синтезу CoQ в мітохондріях серця старих щурів спостерігали достовірне зменшення вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  і тенденцію до зниження значень  $\text{O}_2^-$  і OH-радикалів. Результати, отримані в умовах активації ендогенного синтезу коферменту, дають можливість зробити висновок, що CoQ-залежне відновлення рівня UCP3 у серці старих щурів і прояв коферментом його антиоксидантних і кардіопротекторних ефектів, пов'язаних із інгібуванням МП, можуть сприяти зниженню ступеня оксидативного стресу і тим самим перешкодити прояву мітохондріальної дисфункції в серці при старінні. Результати експериментів дають змогу зробити припущення, що, по-перше, UCP3 не причетні до збільшення пасивної  $\text{H}^+$ -провідності через внутрішню мембрану мітохондрій у серці при старінні, по-друге, кофактор дихального ланцюга CoQ можна віднести до важливих ендогенних регуляторів UCP, зокрема, UCP3 у серці.

Ключові слова: UCP3, мітохондріальна пора, кофермент Q, активні форми кисню, старіння, щури.

### ВСТУП

Відомо, що спряження процесів окиснення та фосфорилування в мітохондріях серця може модулюватися за допомогою функціонування специфічних, так званих роз'єднувальних білків (від англ. uncoupling proteins – UCP) внутрішньої мембрани органел, зокрема UCP2 і UCP3, механізм дії яких, окрім стимулювання протонної провідності за наявності активаторів, зводиться до транспортування вільних жирних кислот

та їх перекисів, регулювання електрогенної кальційтранспортувальної системи мітохондрій тощо [9, 15, 26, 27].

Нині є відомості щодо залучення UCP2 і UCP3 до численних фізіологічних і патологічних процесів. Так, розлади у їх функціонуванні, а також зміни рівнів експресії виявляють при таких захворюваннях, як ожиріння, цукровий діабет 2-го типу, а також ішемічно-реперфузійних порушеннях серця та при старінні [26, 27]. Відомо, що у скелетних м'язах рівні експресії UCP3 під-

вищуються зі змінами ліпідного метаболізму, а саме в умовах голодування, дієти, збагаченої жирами, та при стрептозотциновому діабеті [26] і знижуються – при хронічній гіпоксії, тривалих фізичних навантаженнях і старінні [6, 12, 13, 23]. У разі хронічної серцевої недостатності та інших серцевих ушкодженнях підвищується вміст UCP3 [25, 26]. Тривалі фізичні навантаження та старіння індукують у серці збільшення рівнів експресії UCP2 відносно базального [6, 8]. Вважають, що мітохондріальні білки – UCP2 і UCP3 – необхідні складові ішемічної толерантності [24].

Поряд з такими функціями UCP, як регуляція метаболізму, зокрема енергетичного балансу в клітині [7, 26, 31], є їх здатність попереджати оксидативний стрес, запобігаючи продукуванню мітохондріями активних форм кисню, за допомогою помірної стимуляції пасивної  $H^+$ -провідності через внутрішню мітохондріальну мембрану, яка залежить від функціонування роз'єднувальних білків, АДФ/АТФ-антипортера. Останній являє собою компонент мітохондріальної пори (МП) – аденіннуклеотидтранслоказу. Крім того, UCP, що переважно експресуються у серці та скелетних м'язах, беруть участь у антиоксидантному захисті за допомогою перенесення аніонів перекисей жирних кислот із матриксу мітохондрій у міжмембранний простір, тим самим запобігаючи оксидативному ушкодженню мітохондріальної ДНК і інших важливих для клітини білків [10, 27]. Відомо, що старіння супроводжується оксидативним стресом, який спричиняє в організмі розвиток багатьох патологічних процесів, пов'язаних із дисфункцією мітохондрій [16]. Тому цілком імовірно, що функціонування саме UCP3 може відігравати захисну роль при старінні за допомогою нормалізації окисних процесів. З іншого боку, у патологічних умовах мітохондріальна протонна провідність може значно підвищуватися при формуванні неселективної циклоспоринчутливої МП, яка відіграє ключову роль у роз-

витку апоптозу клітин [19, 28]. За фізіологічного старіння зниження бар'єрних властивостей мембран мітохондрій, яке супроводжується підвищенням чутливості відкриття МП до дії низки індукторів та значним зростанням протонної провідності є одним із проявів функціональних порушень у цих органелах [2].

Деякі автори припускають існування функціонального зв'язку між UCP та важливим внутрішньоклітинним регулятором – коензимом Q (КоQ) з його енергоутворюючою функцією завдяки участі в дихальному ланцюзі мітохондрій [11, 33]. Відомою є і антиоксидантна властивість коферменту. За умов фізіологічного старіння вміст КоQ знижується в деяких тканинах, у тому числі і серцевій [32]. Раніше нами встановлено, що комерційний препарат КоQ<sub>10</sub> проявляв кардіопротекторну дію в умовах ішемії-реперфузії ізольованого за Лангендорфом серця за допомогою інгібування МП [1], у структурі якої містяться убіхінонзв'язувальні сайти [14].

Отже, з одного боку, існує ймовірний зв'язок між вмістом ендogenous регулятора КоQ і функціонуванням UCP3, а з іншого – зв'язок самого коферменту з його модулювальною дією на провідність мітохондріальних мембран, що залежить від відкриття МП. Враховуючи вищевикладене та зважаючи на певну універсальність протекторної дії КоQ, метою нашої роботи було визначити рівні експресії UCP3 і чутливість МП до дії індуктора –  $Ca^{2+}$  в серці старих щурів за умов активації ендogenous синтезу КоQ, а також визначити вміст активних метаболітів кисню, а саме: пероксиду водню ( $H_2O_2$ ), гідроксильного ( $\cdot OH$ ) і супероксидного ( $\cdot O_2^-$ ) радикалів за цих умов.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих білих щурах-самцях лінії Вістар масою 200–250 г віком 6 міс і старих щурах-самцях масою

350–450 г віком 24 міс, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Тварин було поділено на 3 групи: 1-ша група – інтактні дорослі тварини; 2-га – інтактні старі тварини; 3-тя – старі тварини, яким протягом 10 діб вводили *peg os* за допомогою зонда попередники активації ендogenous біосинтезу КоQ: пара-оксибензойну кислоту – речовину, з якої синтезується бензохінонове ядро, метіонін – донор метильних груп, а також модулятор вітамін Е ( $\alpha$ -токоферолацетат), розчинний у рослинній олії [4].

Серця, видалені у декапітованих тварин, ретельно промивали охолодженим 0,9%-м розчином КСІ (2°C), подрібнювали та гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСІ-буфер – 20, ЕДТА – 1; рН 7,4. Мітохондрії виділяли за описаним раніше методом [2].

Дослідження відкривання МП проводили за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання ізольованих мітохондрій серця, як описано нами раніше [2]. Концентрація білка в інкубаційному середовищі становила 0,3 мг/мл.

Рівень експресії UCP3 визначали за допомогою Western-blott-аналізу. Електрофорез білків суспензії мітохондрій серця проводили в 7,5%-му поліакриламідному гелі за наявності додецилсульфату Na за стандартною методикою Леммлі [21] в камері “Hoefler miniVE” (“Amersham”, Англія). Мітохондріальні білки розчиняли в буфері для електрофоретичних зразків, що містив: розчину додецилсульфату Na – 2 %, тріс-НСІ – 51,5 ммоль/л; рН 6,7,  $\beta$ -меркаптоетанолу – 0,82 %, гліцерину – 7,4 %, бромфенолового синього – 0,01 %. В лунку для електрофорезу вносили підготовлений зразок із 100 мкг білка. Після електрофоретичного розподілення білки переносили на PVDF-мембрану (“Sigma”, США) за допомогою системи напівсухого електропере-

несення Hoefler miniVE Blott Module (“Amersham”, Англія). Для цього використовували буфер такого складу: тріс-НСІ – 25 ммоль/л, гліцин – 192 ммоль/л; розчин додецилсульфату Na – 0,1 %, розчин метанолу – 20 %, рН 8,3. Після переносу білків мембрану блокували 5%-м розчином сухого знежиреного молока протягом 18–20 год при 4°C, а потім обробляли первинними моноклональними антитілами до UCP3 (“Sigma”, США) у розведенні 1:500 протягом 2 год при 20 °C. Після цього мембрану відмивали в твін-фосфатному буфері та інкубували з вторинними антикролячими імуноглобулінами G, кон'югованими з пероксидазою хрому (“Sigma”, США) у розведенні 1:4000 у твін-фосфатному буфері протягом 1 год при 20 °C. Для візуального оцінювання за допомогою фарбування перенесених з гелю на мембрану білків використовували субстрат-фарбник для пероксидази – 3-аміно-9-етилкарбазол. Кількісний розрахунок отриманих імуноблотів проводили за допомогою їх сканування та обробки комп'ютерною програмою GelPro.

Вміст активних метаболітів кисню, а саме: пероксиду водню ( $H_2O_2$ ), гідроксильного ( $\cdot OH$ ) і супероксидного ( $\cdot O_2^-$ ) радикалів у суспензії ізольованих мітохондрій серця щурів визначали, як описано раніше [3].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У мітохондріях сердець щурів трьох досліджуваних груп за допомогою методу Western-blotting було ідентифіковано UCP3 (рис. 1). Видно, що мітохондрії серця дорослих щурів (1-ша група) мають певний базальний вміст цього роз'єднувального білка, рівень експресії якого у старих тварин 2-ї групи порівняно з дорослими зменшувався на 63 % (рис. 2). В умовах активації ендogenous біосинтезу КоQ в мітохондріях серця старих щурів (3-тя група) рівень експресії UCP3 майже повністю відновлювався до такого

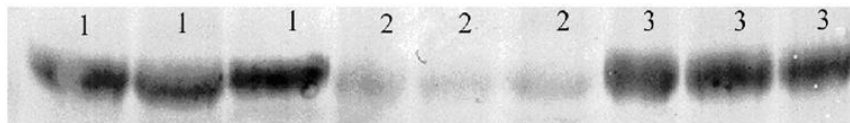


Рис.1. Експресія UCP3 (34 кДа) в мітохондріях серця дорослих (1), старих інтактних щурів (2) і старих щурів після курсового введення їм попередників біосинтезу коферменту (3) (n=6)

щодо значень у 1-й групі (див. рис. 1), і на 55 % щодо значень 2-ї групи (див. рис. 2), що може певною мірою свідчити про відновлення КоQ-залежного транспорту протонів через внутрішню мембрану мітохондрій до його матриксу.

Оскільки UCP3 є мітохондріальним протонним транспортером з високою експресією як у скелетних м'язах, так і в серці, можна припустити подібність фізіологічних функцій цього білка для обох типів м'язів. Зміни рівнів експресії UCP3 у мітохондріях серця, очевидно, можна пов'язувати з функціонуванням дихального ланцюга цих органел, а також із вмістом ендogenous КоQ, що входить до складу трьох дихальних комплексів. Важливою особливістю структури КоQ є здатність до реакцій окиснення – відновлення за допомогою бензохінонового кільця та поліізопренової гідрофобної її частини. На моделі

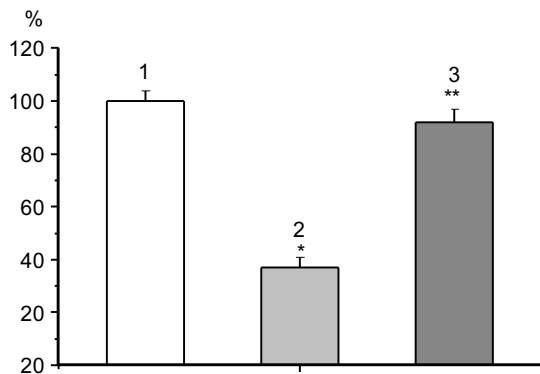
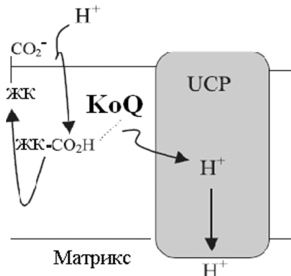


Рис.2. Відносні показники експресії UCP3 у мітохондріях серця: 1 – дорослі щури, 2 – старі інтактні щури, 3 – старі щури після курсового введення їм попередників біосинтезу коферменту (n=6).

\*P<0,05 різниця достовірна порівняно з дорослими щурами, \*\*P<0,05 різниця достовірна порівняно зі старими інтактними щурами

з використанням ліпосом було показано існування функціонального зв'язку між UCP та КоQ: КоQ був обов'язковим кофактором для чутливого до нуклеотидів функціонування UCP1, UCP2 та UCP3 в умовах їх стимуляції вільними жирними кислотами, оскільки за відсутності такого транспорт Н<sup>+</sup> не спостерігали (див. схему) [33].

Дослідження останніх років свідчать, що від редокс-стану КоQ залежить чутливість до пуринових нуклеотидів UCP2 і UCP3 скелетних м'язів при активації їх жирними кислотами. Ці білки нечутливі до гуанідин-3-фосфату в стані 4 дихання (за Б. Чансом), за наявності субстратів дихання та без АДФ, коли КоQ знаходиться переважно у відновленій формі. За таких умов UCP не інгібуються пуриновими нуклеотидами, а вільні жирні кислоти можуть виступати як мітохондріальні роз'єднувачі. На відміну від цього, вищезгадані білки скелетних м'язів інгібуються пуриновими нуклеотидами в стані окисного фосфорилування (стан 3 дихання за наявності субстратів та АДФ), при окисненій формі КоQ, що сприяє



Роль коензиму Q (КоQ) у функціонуванні роз'єднувальних білків (UCP). Протон (H<sup>+</sup>), звільнений з жирної кислоти (ЖК-СО<sub>2</sub>H), транспортується до UCP за допомогою КоQ, який розташований на внутрішній мембрані мітохондрій [Turunen M., 2004]

синтезу АТФ. Припускають, що завдяки функціонуванню UCP2 і UCP3 здійснюється тонка регуляція процесів спряження окиснення та фосфорилування в мітохондріях [18].

Дані літератури демонструють зменшення спряження процесів окиснення–фосфорилування в мітохондріях скелетних м'язів при старінні, що може спричинити зміни клітинного метаболізму та енергетичного статусу клітини [23]. Varazoni та Naig вказують на зниження рівня мРНК UCP3 скелетних м'язів за старіння [6]. Інші автори пов'язують зниження рівня експресії UCP3 в мітохондріях скелетних м'язів при старінні з уповільненням саме стану 4 дихання [20]. Разом з цим при старінні знижується вміст КоQ у деяких тканинах, у тому числі і серцевій [32]. Підтвердженням наших результатів може бути той факт, що в умовах хронічної гіпоксії, яка супроводжує старіння, знижується експресія фактора транскрипції –  $\alpha$ -рецептора активатора проліферації пероксисом PPAR $\alpha$  (від англ. peroxisome proliferator-activated receptor alpha), який вважається центральним регулятором генів, у тому числі і UCP3, залучених до транспорту та метаболізму жирних кислот, що позитивно корелює з експресією цього білка [30].

Відомо, що при старінні та ішемічно-реперфузійних пошкодженнях серця в плазмі крові збільшується вміст вільних довголанцюгових жирних кислот – важливих регуляторів процесу окиснення та фосфорилування, які утворюються при ліполізі (гідролізі нейтрального жиру ліпазою) і спричиняють підвищення протонної провідності внутрішньої мітохондріальної мембрани. Спостереження вказують на те, що від вмісту жирних кислот, можливо, безпосередньо залежить експресія UCP3 у мітохондріях [9]. Показано, що високий вміст вільних жирних кислот корелює зі зростанням експресії UCP3 при хронічній серцевій недостатності, що контролюється PPAR $\alpha$  і пов'язано з уповільненням міто-

хондріального дихання та зниженням ефективної роботи серця [25]. Навпаки, у наших дослідах ми спостерігали зниження рівня експресії UCP3. Можливо, це пояснюється тим, що окиснена форма КоQ, яка переважає при старінні, поряд зі знизеним вмістом загального клітинного пулу коферменту, не сприяє функціонуванню UCP3 як протонного іонофора, активність якого за цих умов інгібується пуриновими нуклеотидами.

Відповідно до цих обставин, ми припускаємо, що зниження рівня експресії UCP3 у мітохондріях серця старих щурів, по-перше, корелює зі знизеним вмістом КоQ як регуляторного кофактора цього білка, а, по-друге, можливо, є наслідком уповільнення мітохондріального дихання в стані 4, причиною якого може бути висока ймовірність перебування КоQ у окисненій формі за умов підвищеного оксидативного стресу, що супроводжує процес фізіологічного старіння. Результати експериментів щодо зниження рівня експресії UCP3 у серці старих щурів на тлі збільшення пасивної протонної провідності через внутрішню мембрану мітохондрій дають можливість зробити припущення, що UCP3 не причетний до цього процесу, як було показано для UCP2 [5, 6, 29].

В умовах активації ендogenous синтезу КоQ в мітохондріях серця старих щурів рівень експресії UCP3 підвищувався на 55 % у порівнянні з інтактними старими щурами (див. рис. 1, 2), що може певною мірою свідчити про відновлення КоQ-залежного транспорту протонів через внутрішню мембрану мітохондрій до їх матриксу. Так, раніше нами було показано, що введення старим тваринам попередників активації біосинтезу КоQ призводило до підвищення його вмісту в мітохондріях серця порівняно з інтактними старими щурами [4]. Отже, зміни рівня експресії UCP3, імовірно, залежать від вмісту КоQ в мітохондріях серця старих щурів. КоQ-індуковане відновлення рівня експресії UCP3 в мітохонд-

ріях серця старих щурів, на відміну від низького рівня цього білка у старих (інтактних) тварин, безумовно, є проявом позитивної коригуючої дії попередників активації біосинтезу КоQ на функціональний стан мітохондрій серця старих щурів. Відтак, кофактор дихального ланцюга – КоQ можна віднести до важливих ендogenous регуляторів UCP, зокрема UCP3, у серці щурів. Активація цих білків може спричиняти кардіопротекторний ефект і, таким чином, відноситися до ендogenous механізмів захисту як на рівні клітин, так і цілого організму.

Оскільки відомо, що з віком відбувається інтенсифікація вільнорадикальних процесів у різних органах, в тому числі і серці, тому наступним етапом нашої роботи було дослідити значення таких радикалів, як  $\cdot O_2^-$  і  $\cdot OH$ , а також  $H_2O_2$  в мітохондріях серця старих щурів за умов активації ендogenous синтезу КоQ (рис. 3). Так, вміст  $\cdot O_2^-$  у старих інтактних щурів становив  $(18,2 \pm 0,74)$  нмоль $\cdot$ хв $^{-1}$  $\cdot$ мг $^{-1}$ білка, що більше ніж у чотири рази порівняно зі значеннями у дорослих тварин:  $(4,46 \pm 0,41)$  нмоль $\cdot$ хв $^{-1}$  $\cdot$ мг $^{-1}$ білка. Це свідчить про посилення продукції  $\cdot O_2^-$  в серці з віком (див. рис. 3, а). Вміст  $H_2O_2$  у старих інтактних щурів становив  $(42,0 \pm 1,43)$  пмоль $\cdot$ мг $^{-1}$ білка, що достовірно було вищим порівняно з дорослими щурами:  $(15,32 \pm 0,32)$  пмоль $\cdot$ мг $^{-1}$ білка (див. рис. 3, б). Вміст  $\cdot OH$  у старих інтактних щурів теж був вищим порівняно з дорослими тваринами і становив  $(1,91 \pm 0,18)$  і  $(0,70 \pm 0,07)$   $\Delta E \cdot$ хв $^{-1}$  $\cdot$ мг $^{-1}$ білка відповідно (див. рис. 3, в). Оскільки значення показників вільнорадикального стану в мітохондріях серця старих щурів достовірно були вищими щодо значень дорослих щурів, можна стверджувати, що з віком у мітохондріях підвищується інтенсивність утворення вільних радикалів кисню. Наші результати підтверджуються даними інших авторів про підвищення продукції вільних радикалів кисню у мітохондріях серця старих тварин [22].

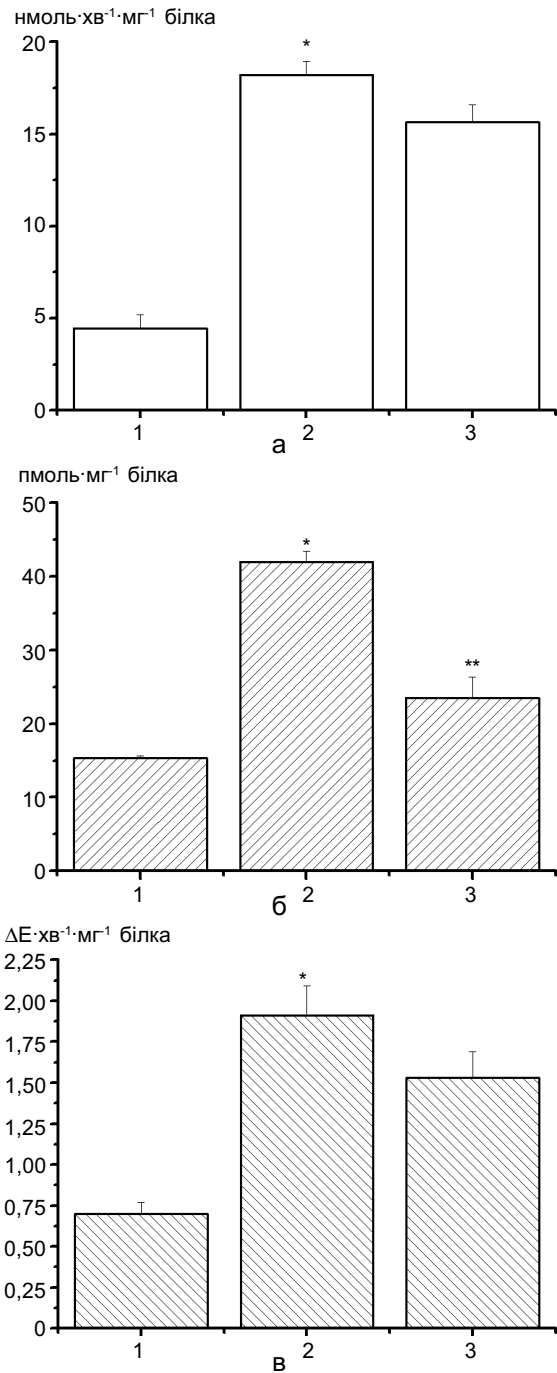


Рис. 3. Вміст супероксидного радикала (а) та гідроксильного радикала (в) та перексиду водню (б) у мітохондріях серця щурів (n=5): 1 – дорослі щури; 2 – старі інтактні щури; 3 – старі щури після курсового введення їм попередників біосинтезу КоQ.

\*P<0,05 різниця достовірна порівняно з дорослими щурами, \*\*P<0,05 різниця достовірна порівняно зі старими інтактними щурами

В умовах активації ендogenous синтезу КоQ в мітохондріях серця старих щурів вміст  $H_2O_2$  достовірно знижувався ( $23,54 \pm 2,84$ )  $\mu\text{моль} \cdot \text{мг}^{-1}$  білка) у порівнянні зі значенням у старих тварин ( $42,0 \pm 1,43$ )  $\mu\text{моль} \cdot \text{мг}^{-1}$  білка ( $P \leq 0,01$ ; див. рис. 3, б). За таких умов у мітохондріях серця старих щурів інші показники –  $\cdot O_2^-$  та  $\cdot OH$  радикалів мали лише тенденцію до зменшення: ( $15,63 \pm 0,97$ )  $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білка і ( $1,53 \pm 0,17$ )  $\Delta E \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білка порівняно зі старими тваринами: ( $18,2 \pm 0,74$ )  $\text{нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білка і ( $1,91 \pm 0,18$ )  $\Delta E \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білка відповідно (див. рис. 3, а, в). Таким чином, по-перше, наші результати підтверджують посилення розвитку оксидативного стресу в серці старих тварин, по-друге, підвищення вмісту КоQ поряд з КоQ-індукованим відновленням рівня експресії UCP3 в мітохондріях серця старих тварин в умовах активації ендogenous синтезу коферменту сприяє поліпшенню ситуації зі станом вільнорадикальних процесів. Слід відмітити, що наші результати з визначення рівнів експресії UCP3 в умовах підвищення вмісту КоQ узгоджуються з даними, отриманими іншими авторами щодо існування кореляції між зниженням продукції вільних радикалів кисню та підвищенням рівня експресії UCP3 [15].

При старінні посилюються окисні процеси, які призводять до ушкодження, зокрема, ліпідів мітохондріальних мембран, внаслідок чого збільшується пасивна протонна провідність і порушується спряження процесу окиснення та фосфорилування [16, 23]. Разом з тим за умов оксидативного стресу, що супроводжує старіння, збільшується провідність мітохондріальних мембран, залежна від відкриття МП, яка індукується, підвищеними в мітохондріальному матриксі концентраціями  $Ca^{2+}$ . З одного боку, існує зв'язок між збільшенням продукції вільних радикалів та індукцією МП, з іншого – між експресією UCP3, яка залежить від окисно-

відновного стану КоQ, та вільнорадикальними процесами. Виходячи з отриманих нами результатів щодо зниження рівнів активних форм кисню в умовах стимуляції синтезу КоQ, а також щодо КоQ-залежного відновлення рівня експресії UCP3 у мітохондріях серця старих щурів, доцільно було дослідити чутливість МП до дії її природного індуктора  $Ca^{2+}$  в серці старих щурів за умов активації ендogenous синтезу КоQ.

Криві реєстрації набухання мітохондрій сердець трьох досліджуваних груп у безкальцієвому середовищі представлені на рис. 4, а кальційіндуковане набухання органел – на рис. 5. Встановлено, що за відсутності індуктора  $Ca^{2+}$  величина набухання мітохондрій серця у 2-й групі тварин відрізнялася від значень 1-ї групи: різниця між цими величинами на 15 хв реєстрації становила 6 % (див. рис. 4). В умовах активації біосинтезу КоQ у старих тварин захисний ефект від набухання мітохондрій був 42 % у порівнянні з 2-ю групою тварин.

За наявності в середовищі  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л) спостерігали суттєве набухання мітохондрій серця тварин 2-ї групи, величина якого на 14 % перевищувала таку 1-ї групи (див. рис. 5). Активація ендogenous синтезу КоQ у старих щурів (3-тя група) за

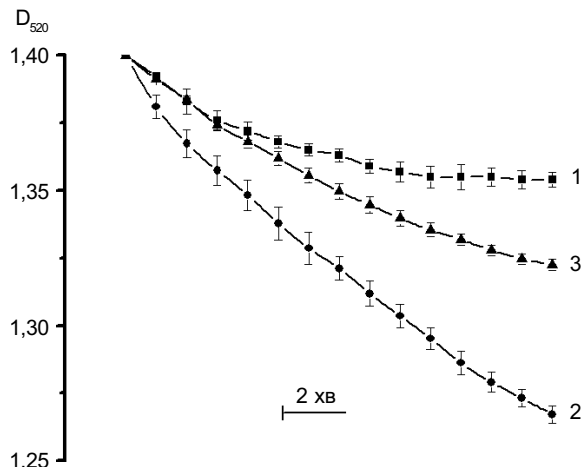


Рис. 4. Набухання мітохондрій серця дорослих (1), старих інтактних щурів (2) та старих щурів після курсового введення їм попередників біосинтезу коферменту Q (3) без індуктора  $Ca^{2+}$  (n=5)

наявності  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі спричиняла зменшення величини набухання мітохондрій у порівнянні зі значеннями тварин 2-ї групи: захисний ефект становив 78 % (див. рис. 5). Таким чином, у результаті активації ендogenous синтезу КоQ зменшується чутливість відкривання МП у порівнянні зі старими щурами у разі відсутності будь-якого індуктора та при кальцієвому навантаженні. Для тестування кальційіндукованого набухання мітохондрій як такого, що відбувається внаслідок відкривання класичної МП, використовували специфічний інгібітор МП циклоспорин А. Останній у концентрації  $10^{-5}$  моль/л частково інгібував кальційіндуковане набухання мітохондрій у серці старих щурів і повністю – в мітохондріях серця старих щурів, яким вводили попередники активації синтезу КоQ, що вказує на зникнення циклоспорину А-нечутливої компоненти МП, наявність якої спостерігається в мітохондріях старих тварин [17]. Встановлений дозозалежний ефект дії  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-7}$ – $10^{-4}$  моль/л) на набухання мітохондрій у трьох досліджуваних групах тварин

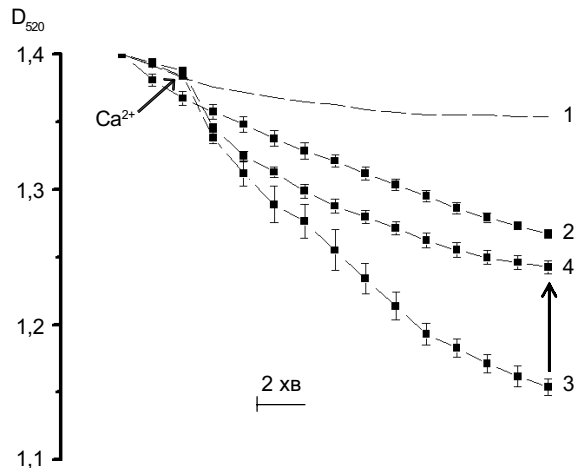


Рис.5. Набухання мітохондрій серця старих щурів після курсового введення їм попередників біосинтезу коферменту Q в умовах дії індуктора  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л) ( $n=5$ ): 1 – мітохондрії серця дорослих (контрольних) щурів; 2 – мітохондрії серця старих інтактних щурів; 3 – мітохондрії серця старих інтактних щурів і дія  $\text{Ca}^{2+}$ ; 4 – мітохондрії серця старих щурів після введення їм попередників біосинтезу коензиму Q і дія  $\text{Ca}^{2+}$

свідчить про порушення бар'єрних властивостей мітохондріальних мембран у серці старих щурів і часткове відновлення цих властивостей в умовах ендogenous активації біосинтезу КоQ [4].

На підставі проведених експериментів можна зробити висновок, що за умов стимуляції біосинтезу КоQ зменшується чутливість МП до індуктора  $\text{Ca}^{2+}$  в серці старих щурів. Отже, регуляція відкривання МП може здійснюватися, ймовірно, за участю ендogenous пулу КоQ. З одного боку, зменшення пулу КоQ може бути однією з причин підвищеної чутливості кальційіндукованого відкривання МП у серці старих щурів, тоді як його відновлення певною мірою проявляється у підвищенні резистентності мітохондріальної мембрани до дії природного індуктора відкривання МП  $\text{Ca}^{2+}$ . Отже, ендogenous шлях підвищення вмісту КоQ, зокрема в мітохондріях, є перспективним у попередженні порушень серцево-судинної системи, пов'язаних із дисфункцією мітохондрій при старінні.

Таким чином, нами показано залежне від віку зменшення на 63% рівня експресії UCP3 порівняно з таким у дорослих щурів поряд з підвищеною чутливістю відкривання МП за умов дії природного індуктора  $\text{Ca}^{2+}$  в серці старих щурів. В умовах активації біосинтезу КоQ практично повністю відновлювався рівень експресії UCP3 у серці старих щурів до такого у дорослих тварин. У цих умовах спостерігали зниження чутливості відкривання МП до  $\text{Ca}^{2+}$  в серці старих щурів. Можливо, існує залежність між зміною рівня експресії UCP3 та чутливістю МП до індуктора її відкривання в серці старих щурів. Наші результати щодо підвищеного вмісту в мітохондріях серця старих щурів радикалів  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$  і  $\text{H}_2\text{O}_2$  порівняно зі значеннями у дорослих тварин свідчать про інтенсифікацію вільнорадикальних процесів з віком. Зменшення вмісту цих радикалів у мітохондріях серця старих щурів в умовах активації ендogenous



ного синтезу КоQ узгоджуються з результатами щодо відновлення експресії UCP3 в цих органелах. Наші результати експериментів в умовах активації ендogenous синтезу коферменту дають підставу зробити висновок, що КоQ-залежне відновлення рівня експресії UCP3 у серці старих щурів і здійснення коферментом його антиоксидантних і кардіопротекторних ефектів, пов'язаних із інгібуванням МП, можуть знижувати рівень оксидативного стресу і тим самим запобігати розвитку мітохондріальної дисфункції в серці при старінні. Отже, стимулювання ендogenous синтезу КоQ може бути основою фізіологічної моделі для підтримки базального вмісту UCP3 у серці та одним із механізмів кардіопротекторної дії убихінону через інгібування МП при старінні.

*Висловлюємо подяку завідувачу відділу біохімії коферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ член.-кор. НАНУ Донченку Г.В. та співробітникам Кучменко О.Б. і Петухову Д.М. за допомогу у здійсненні на старих щурах моделі активації ендogenous синтезу КоQ.*

**Н.А. Струтинская, С.В. Тимошук, Г.Л. Вавилова, А.В. Коцюрба, В.Ф. Сагач**

**ЭКСПРЕССИЯ UCP3 И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ К ИНДУКТОРУ  $Ca^{2+}$  В СЕРДЦЕ СТАРЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ АКТИВАЦИИ БИОСИНТЕЗА КОЭНЗИНА Q**

Исследовали экспрессию митохондриального разобщающего белка 3 (UCP3) и чувствительность митохондриальной поры (МП) к действию ее природного индуктора  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  моль/л) в сердце старых крыс в условиях активации *in vivo* синтеза убихинона – кофермента Q, (КоQ) путем введения животным его предшественников (параоксибензойной кислоты, аминокислоты метионина и модулятора витамина E). Показано уменьшение на 63 % уровня экспрессии белка UCP3 у старых крыс по сравнению с таковым у взрослых при повышенной чувствительности МП при кальциевой нагрузке в сердце старых животных. В условиях активации ендogenous синтеза КоQ происходило практически полное восстановление уровня экспрессии белка UCP3 в сердце старых крыс по сравнению с таковым у взрослых. При этом

наблюдали снижение чувствительности МП к индуктору ее открывания кальцию в сердце старых крыс. Следует отметить повышение содержания в митохондриях сердца старых крыс супероксидного ( $O_2^-$ ) и гидроксильного ( $\cdot OH$ ) радикалов, а также стабильного метаболита активного кислорода перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) по сравнению с взрослыми животными. В условиях активации ендogenous синтеза КоQ в митохондриях сердца старых крыс наблюдали достоверное уменьшение содержания  $H_2O_2$  и тенденцию к снижению значений  $O_2^-$  и  $\cdot OH$ . Результаты, полученные в условиях активации ендogenous синтеза кофермента, дают возможность сделать вывод, что КоQ-зависимое восстановление уровня экспрессии UCP3 в сердце старых крыс и проявление коферментом его антиоксидантных и кардиопротекторных эффектов, связанных с ингибированием МП, могут способствовать снижению степени окислительного стресса и тем самым препятствовать проявлению митохондриальной дисфункции в сердце при старении. Результаты экспериментов позволяют сделать предположение, что, во-первых, UCP3 не причастны к увеличению пассивной  $H^+$ -проводимости через внутреннюю мембрану митохондрий в сердце при старении, во-вторых, кофактор дыхательной цепи КоQ можно отнести к важным ендogenous регуляторам UCP, в частности, UCP3 в сердце.

Ключевые слова: UCP3, митохондриальная пора, кофермент Q, активные формы кислорода, старение, крысы

**N. A. Strutynska, S.V. Timoshchuk, G.L.Vavilova, A.V. Kotsuruba, V.F.Sagach**

**EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL UNCOUPLING PROTEIN 3 AND THE SENSITIVITY OF MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING TO  $Ca^{2+}$  IN OLD RAT HEART UNDER ACTIVATION OF BIOSYNTHESIS OF COENZYME Q.**

The expression of mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3), as well as the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening (MPTP) to  $Ca^{2+}$  ( $10^{-4}$  mol/l) in old rat heart under activation *in vivo* of ubiquinone synthesis - coenzyme Q, (CoQ) via administration of the precursors (4-hydroxybenzoic acid, aminoacid methionine and modulator vitamin E) were studied. It was shown that the expression level of UCP3 decreased by 63% in old rats compared to adult rats and this was accompanied by an increased sensitivity of the MPT to calcium. Under activation of endogenous synthesis of CoQ it was observed almost complete restoration of UCP3 expression in old rat heart and a decrease in the sensitivity of the MPTP opening to  $Ca^{2+}$ . In mitochondria from old rat hearts we noted an increased content of the superoxide ( $O_2^-$ ) and hydroxyl ( $\cdot OH$ ) radicals and of the stable metabolite of active oxygen species hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), as compared to those in adult animals. Following activation of endogenous synthesis of CoQ in old rat heart mitochondria it was observed a decreased content of  $H_2O_2$ , and

the tendency for decreasing the levels of the radicals  $\text{яO}_2$  and  $\text{яOH}$ . The results obtained allowed to conclude that the CoQ-dependent restoration of the UCP3 levels in old rat heart and antioxidant/cardioprotective effects of CoQ related to the MPTP opening inhibition can reduce the oxidative stress and thus prevent the manifestation of mitochondrial dysfunction in aging heart. We suggest that UCP3 is not involved in the increase of the passive  $\text{H}^+$ -conductance through the inner mitochondrial membrane in the aging heart, and that CoQ as a factor of respiratory chain could be an important endogenous regulator of the uncoupling proteins, in particular UCP3, in the heart.  
Key words: UCP 3 protein, mitochondrial permeability transition pore, coenzyme Q, active oxygen radicals, aging, rat.

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

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Рудик О.В. та ін. Інгібування мітохондріальної пори як один із механізмів кардіопротекторної дії коензиму  $\text{Q}_{10}$  // *Фізіол. журн.* – 2007. – **53**, №4. – С. 35–42.
- Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Рудик О.В. Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори в серці щурів // *Фізіол. журн.* – 2004. – **50**, № 2. – С. 49–63.
- Сагач В.Ф., Рудик О.В., Вавілова Г.Л. та ін. Мелатонін відновлює ішемічну толерантність і зменшує чутливість відкриття мітохондріальної пори в серці старих щурів // *Фізіол. журн.* – 2006. – **52**, №3. – С. 3–14.
- Тімошук С.В., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А. та ін. Вплив попередників біосинтезу убіхінону *in vivo* на чутливість відкриття мітохондріальної пори у серці старих щурів // *Фізіол. журн.* – 2008. – **54**, №3. – С.3–9.
- Amaral S., Mota P., Rodrigues A.S. et al. Testicular aging involves mitochondrial dysfunction as well as an increase in UCP2 levels and proton leak // *FEBS Lett.* – 2008. – **582**. – P. 4191–4196.
- Barazzoni R., Nair K.S. Changes in uncoupling protein-2 and -3 expression in aging rat skeletal muscle, liver, and heart // *Amer. J. Phys. Endocrinol. Met.* – 2001. – **280**, № 3. – P.413–419.
- Berzaira V., Seifert E. L., Harper M-E. Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery // *J. FASEB.* – 2007. – **21**. – P.312–324.
- Bo H., Jiang N., Ma G. et al. Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2 // *Free Radic. Biol. and Med.* – 2008. – **44**, № 7. – P.1373–1381.
- Boss O., Hagen T., Lowell B.B. Uncoupling proteins 2 and 3. Potential regulators of mitochondrial energy metabolism // *Diabetes.* – 2000. – **49**. – P.143–156.
- Cannon B., Shabalina I.G., Kramarova T.V. et al. Uncoupling proteins: A role in protection against reactive oxygen species – or not? // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 2006. – **1757**. – P. 449–458.
- Echtay K.S., Murphy M.P., Smith R.A. J. et al. Superoxide activates nucleotide-sensitive mitochondrial proton transport through the uncoupling proteins UCP1, UCP2, and UCP3 // *Nature.* – 2002. – **415**. – P. 1482–1486.
- Essop M. F., Razeghi P., McLeod C. et al. Hypoxia-induced decrease of UCP3 gene expression in rat heart parallels metabolic gene switching but fails to affect mitochondrial respiratory coupling // *Biochim. and Biophys. Res. Commun.* – 2004. – **314**. – P. 561–564.
- Fernstrom M., Tonkonogi M., Sahlin K. Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle // *J. Physiol.* – 2003. – **554**, №3. – P.755–763.
- Fontaine E., Ichas F., Bernardi P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**, № 40. – P.25734–25740.
- Graier W.F., Trenker M., Malli R. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ , the secret behind the function of uncoupling proteins 2 and 3? // *Cell Calcium.* – 2008. – **44**. – P. 36–50.
- Harman D. The aging process // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1981. – 78. – P.7124–7128.
- He L., Lemasters J.J. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? // *FEBS Lett.* – 2002. – **512**. – P.1–7.
- Hirabara S.M., Silveira L.R., Abdulkader F.R.M. et al. Role of fatty acids in the transition from anaerobic to aerobic metabolism in skeletal muscle during exercise // *Cell Biochem. Funct.* – 2006. – **24**. – P.475–481.
- Juhaszova M., Wang S., Zorov D.B. et al. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown // *Ann. N-Y Acad. Sci.* – 2008. – **1123**. – P.197–212.
- Kerner J., Turkaly P.J., Minkler P.E., Hoppel C.L. Aging skeletal muscle mitochondria in the rat: decreased uncoupling protein-3 content // *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2001. – 281. – P. 1054–1062.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**. – P. 680–685.
- Lesnefsky E.J., Hoppel C.L. Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of the mitochondria // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 2003. – **420**, № 2. – P.287–297.
- Marcinek D.J., Schenkman K.A., Ciesielski W.A. et al. Reduced mitochondrial coupling *in vivo* alters cellular energetics in aged mouse skeletal muscle // *J. Physiol.* – 2005. – **569**, №2 – P.467–473.
- McLeod C.J., Aziz A., Hoyt R. F. et al. Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**, №39. – P. 33470–33476.
- Murray A.J., Cole M.A., Lygate C.A. et al. Increased mitochondrial uncoupling proteins, respiratory uncou-

- pling and decreased efficiency in the chronically infarcted rat heart // *J. Mol. and Cell. Cardiol.* – 2008. – **44**. – P. 694–700.
26. Nabben M., Hoeks J. Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac- and skeletal muscle metabolism // *Physiol. and Behavior.* – 2008. – **94**. – P. 259–269.
27. Nedergaard J., Cannon B. The ‘novel’ ‘uncoupling’ proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions // *J. Exp. Physiol.* – 2003. – **88**, №1. – P. 65–84.
28. O'Rourke B. Mitochondrial ion channels // *Ann. Rev. Physiol.* – 2007. – **69**. – P.19–49.
29. Pepe S. Mitochondrial function in ischaemia and reperfusion of the ageing heart // *Clin. and Exp. Pharmacol. and Physiol.* – 2001. – **27**, № 9. – P.745–750.
30. Razeghi P., Young M.E., Abbasi S., Taegtmeier H. Hypoxia in vivo decreases peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression in rat heart // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2001. – **287**. – P. 5–10.
31. Ricquier D., Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance // *J. Physiol.* – 2000. – **529**. – P.3–10.
32. Sohal R.S., Forster M.J. Coenzyme Q, oxidative stress and aging // *Mitochondrion.* – 2007. – **7S** – P.103–111.
33. Turunen M., Olsson J., Dallner G. Metabolism and function coenzyme Q // *Biochim. and Biophys. Acta* – 2004. – **1660**. – P. 171–199.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*  
*E-mail: na-strutynsks@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до редакції 05.03.2009*