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

Панасюк Ольга Сергіївна

УДК 577.115.3+576.311.347

ВПЛИВ СКЛАДОВИХ ФОСФОЛІПІДІВ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЕНДОТЕЛІЮ І МІТОХОНДРІЙ СЕРЦЯ

03.00.13 – Фізіологія людини і тварин

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ — 2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України.

Науковий керівник: академік НАН України
Мойбенко Олексій Олексійович
завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології
Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України
доктор медичних наук, професор

кандидат біологічних наук
Бондаренко Олександр Іванович,
старший науковий співробітник
відділу фізіології кровообігу
Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Манько Володимир Васильович,
завідувач кафедри фізіології людини і тварин
Львівського національного університету імені Івана Франка

доктор медичних наук, професор
Соловйов Анатолій Іванович
завідувач відділу фармакології клітинних сигнальних систем
та експериментальної терапії
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ»,

Захист дисертації відбудеться «09» лютого 2021 р. о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології імені О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України та на сайті інституту:
http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий *«30» грудня 2021 р.*

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук О.П. Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність Серед надзвичайного різноманіття ліпідних сполук, що входять до складу біологічних мембран, фосфоліпіди (ФЛ) – їх ключовий компонент. Хоча формування стабільної двошарової молекулярної мембранної структури могло би бути забезпечене одним чи двома різновидами фосфоліпідів, але адаптивність мембран до зовнішньоклітинного середовища стає можливою лише за наявності широкого спектру ліпідних сполук у їх складі. Надзвичайна різноманітність (до 2000 видів) ФЛ визначається специфічністю структури та функційних властивостей їх полярних груп голівок та жирнокислотних залишків. При дії фосфоліпази А2 з гліцерофосфоліпідів утворюються лізофосфоліпіди та вільні жирні кислоти (ЖК), після чого ці сполуки можуть поєднуватись в нових комбінаціях.

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

Давно помічено, що споживання таких ЖК, як омега-3 ПНЖК, спричиняє позитивний вплив на виникнення та тяжкість ССЗ [Bjerregaard P, 1988]. Хоча механізми, які забезпечують захисний вплив омега-3 ПНЖК на судини і серцевий м’яз, до кінця не з'ясовані, літературні дані свідчать, що подібний захист може бути пояснений не лише дією цих кислот на плазматичну мембрану клітин міокарда, але й впливом на мітохондрії міокарда та на судинний ендотелій; останній бере активну участь в регуляції кровопостачання тканин. В той же час слід мати на увазі, що ЖК легко абсорбуються та поширюються по всіх тканинах тіла, в тому числі в серцево-судинній системі.

Відомо також, що в серцевому м'язі є дві функціонально різні субпопуляції мітохондрій — субсарколемальні (СС) та інтерфібрілярні (ІФ), проте роль функціональної гетерогенності мітохондрій міокарда в нормі та при патології поки не з’ясована.

Пошук шляхів фармакологічної регуляції функцій мітохондрій та мітохондріального метаболізму є актуальною проблемою сучасної фізіології, оскільки оптимізація їх функцій може відігравати значну роль в попередженні ушкоджень міокарда. Фармакологічна індукція ІМ ізопротеренолом у щурів є зручною моделлю подібної патології з досить низькою смертністю тварин.

В регуляції функціонального стану мітохондрій важливу роль відіграють мітохондріальні пори перемінної проникності (МППП). Результати найновіших досліджень свідчать про залучення мітохондріальних ВКСа-каналів у механізми кардіопротекції під час ішемічно-реперфузійного пошкодження серця [Frankenreiter, 2017; Goswami, 2019].

Необхідно визнати, що механізми впливу омега-3 ПНЖК на мітохондріальний апарат серця та судинний ендотелій поки що вивчені недостатньо. Можлива захисна роль омега-3 ПНЖК щодо попередження пошкодження (зокрема порушення окисного фосфорилювання і кальційіндукованого набухання) різних фракцій мітохондрій при ізопротеренолiндукованому пошкодженні серцевого м'язу також не досліджена.

Функції ендотеліальних клітин та мітохондрій регулюються їх електричними реакціями (значною мірою такими, що або безпосередньо детермінуються транспортом іонів кальцію через мембрану, або істотно впливають на цей процес). Визначення механізмів впливу омега-3 ПНЖК на функціональний стан мітохондрій та ролі ВКСа-каналів і МППП у омега-3 ПНЖК-опосередкованій сигналізації в мітохондріях і ендотеліальних клітинах є важливим для розширення сучасних уявлень щодо механізмів кардіопротекції та визначення альтернативних молекулярних мішеней в процесі пошуку нових терапевтичних підходів у кардіозахисті.

Щодо другого компонента фосфоліпідів, який утворюється при від'єднанні від них омега-3 ПНЖК, а саме лізофосфоліпідів (ЛФЛ), то їх фізіологічна роль до кінця не з'ясована. Ці сполуки широко відомі як группа прозапальних ліпідів, задіяних в патогенез атеросклероза. У той же час повідомлялося, що ЛФЛ здатні забезпечувати потужний нейропротекторний ефект [Blondeau, 2002]. Серед усього різноманіття ЛФЛ, лізофосфатидилхолін (ЛФХ) та лізофосфатидилінозитол (ЛФІ) виділяються на даний час завдяки своїм вазоактивним властивостям, складній фармакології та фізіологічному значенню. Але відомості щодо впливів ЛФХ та ЛФІ на вазомоторні властивості судин та судинну сигналізацію залишається суперечливим**.** Запропоновано різні гіпотези відносно механізмів дії ЛФХ на ендотелійзалежну релаксацію. Отже, у сукупності механізми, що лежать в основі як стимулювання, так і пригнічення ендотелійзалежного розслаблення при дії ЛФЛ, досі не розкриті.

Зв'язок з темами дослідницьких робіт. Роботу виконано в рамках тем НДР відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України: «Системні та молекулярно-генетичні дослідження механізмів розвитку гіпертрофії та недостатності серця» (№ 0110U004753) та «Дослідження механізмів ремоделювання міокарда в патогенезі розвитку серцевої недостатності та її корекції» (№ 0114U007233). Робота була виконана за часткової підтримки австрійського наукового фонду (FWF, номер гранту P27238-B27) та швейцарського національного наукового фонду (SNSF, номер гранту IZ73Z0_152578).

Метою дисертаційної роботи було з'ясування механізмів впливу складових фосфоліпідів на функціональний стан ендотеліальних клітин і мітохондрій серця експериментальних тварин.

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

1. Виявити можливі особливості впливу тривалого споживання омега-3 ПНЖК на Ca^{2+}-індуковане відкривання мітохондріальних пор перемінної проникності субсарколемальної та інтерфібрилярної фракцій мітохондрій.
2. З'ясувати можливі відмінності у чутливості МППП до відкриття у субсарколемальній та інтерфібрилярній фракціях мітохондрій міокарда щурів при експериментальному інфаркті міокарду щурів.
3. Виявити та охарактеризувати вплив тривалого споживання омега-3 ПНЖК на чутливість МППП до відкриття субсарколемальної та інтерфібрилярної фракцій мітохондрій та на параметри дихання мітохондрій серця щурів при експериментальному інфаркті міокарда.
4. Визначити безпосередній вплив омега-3 ПНЖК на електричні реакції внутрішньої мембрани мітохондрій серцевих клітин.
5. З'ясувати можливу участь мітохондріальних ВКСа-каналів в регуляції параметрів дихання мітохондрій міокарда під впливом омега-3 ПНЖК.
6. Визначити безпосередній вплив омега-3 ПНЖК та біологічно активних фосфоліпідів лізофосфатидилінозитолу та лізофосфатидилхоліну на електричні реакції ендотеліальних клітин.

Об'єкт дослідження: ендогенні механізми кардіопротекції.

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

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

Наукова новизна. Отримані результати свідчать, що інтерфібрилярна та субсарколемальна фракції мітохондрій в умовах контролю проявляють приблизно однакову чутливість до кальційіндукованого набухання, проте захисний ефект омега-3 ПНЖК є значно більш вираженим щодо мітохондрій інтерфібрилярних, ніж щодо субсарколемальних мітохондрій.

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

Встановлено деталі молекулярних механізмів кардіопротекторного впливу омега-3 ПНЖК. Показана роль мітохондріальних та ендотеліальних ВКСа-каналів в кардіопротекції при дії омега-3 ПНЖК. Експериментально продемонстровано, що докозагексаєнова кислота (ДГК), ПНЖК класу омега-3, при її дії на внутрішню мітохондріальну мембрану кардіальних клітин збільшує активність ендогенно експрессованих мітохондріальних ВКСа-каналів не змінюючи амплітуди струму

через поодинокі канали. Продемонстровано, що ДГК викликає гіперполяризацію ендотеліальних клітин внаслідок стимуляції ендотеліальних ВКСа-каналів (ефект, що потенціює ендотелійзалежне розслаблення судин). Вперше експериментально продемонстровано, що чутливість ВКСа-каналів до омега-3 ПНЖК залежить від рівня мембранного холестерину.

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

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

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

Особистий внесок Дисертантом особисто налагоджено метод ізоляції двох мітохондріальних фракцій міокардіальних клітин і проведено ізоляцію мітохондрій для всіх подальших експериментів. Здобувачем особисто виконано весь обсяг експериментальної роботи на ізольованих мітохондріях з подальшою статистичною обробкою і частково на культивованих клітинах і ізольованих судинах. Дисертант активно обговорювала отримані результати із співавторами і керівниками проекту. Інтерпретація отриманих даних і формулювання висновків виконана разом з керівниками роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні положення й результати дисертації були представлені та обговорені на таких науково-практичних конференціях та конгресах: 2nd International Graz Symposium on Lipid and Membrane biology: Focus on Lipotoxicity (Грац, Австрія, 13-15 березня, 2008), 28th Meeting of the European Section of the International Society for Heart Research (May 28-31, Athens 2008), VI Нац. Конгрес патофізіологів України з міжнар. Участю (Сімферополь-Міскор, Україна, 3-5жовтня 2012), 2nd MiP Summer School on mitochondrial respiratory physiology (July 12-18, 2008 Schröcken, Vorarlberg, Austria), «Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології» (23-25.09.2014, Вінниця, Україна), 51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (Генуя, Італія, (May 17-19, 2017), 5-й З'їзд Українського тов. клітинної біології з міжн. Представництвом (2-6 жовтня, 2016, Одеса, Україна).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковані у **15** публікаціях, з яких **8** – статті у наукових фахових журналах, як з переліку фахових видань МОН України, так і в міжнародних виданнях, та **7** – тези доповідей на наукових конференціях.

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

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень Дослідження було проведено на 58 тваринах (45 щурах та 13 мишах) та на культурі клітин (кардіальні клітини лінії HL-1 та ендотеліальні клітини EA.hy926). Об'єктами досліджень були мітохондрії серця щурів, культура кардіальних клітин лінії HL-1 та ендотеліальних клітин EA.hy926, препарати аорти мишей.

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

Дослідження **розділу 1** були проведені на 11 самцях щурів. Тварини були розподілені на 2 групи: **I** – контрольні щури (n=5); **II –** щури, які отримували примусово перорально препарат «Епадол» у дозі 0,1 мг/100 г маси тіла протягом 4 тиж (n=6). («Епадол» містить 45% омега-3 ПНЖК тваринного походження (суміш ейкозапентаєнової і докозагексаєнової кислот з риб`ячого жиру).

Дослідження **розділу 2** були проведені на 24 самцях щурів. Тварини були розподілені на 3 групи: **I** – контрольні щури (n=7); **II** – щури, яким вводили підшкірно розчин ізопротеренолу («Sigma», США) в дозі 60мг/кг двічі з інтервалом 24 год, (n=7); **III** – щури, які отримували примусово перорально препарат «Епадол» у дозі 0,1 мг/100 г маси тіла протягом 4 тиж, потім тваринам вводили ізопротеренол так, як у III групі, (n=10). Тварин, яким вводили ізопротеренол, декапітували через добу після останньої ін'єкції.

Досліди **розділу 3** проводили на культурі кардіальних клітин лінії HL-1, досліди **розділу 4** – на 10 самцях щурів. Досліди **розділу 5** проводили на культурі ендотеліальних клітин EA.hy926; експерименти **розділу 6** проводили на 13-ти мишах C57Bl/6 обох статей у віці 12 – 16 тижнів та на культурі ендотеліальних клітин EA.hy926. Евтаназія мишей відбувалася за допомогою шийної дислокації.

Експериментальні розчини та середовище для культивування клітин Під час проведення експериментів, а також у перебігу виділення мітохондрій, приготування препаратів аорти та культур клітин використовували такі розчини та середовище для культивування: Лінію ендотеліальних клітин людської пуповинної вени (EA.hy926) вирощували в середовищі DMEM, що містив 10% фетальної бичачої сироватки, 1% пеніциліну/стрептоміцину і 1% HAT (5 **–** мМ гіпоксантин, 20 **–** мкМ аміноптерін, 0,8 – мМ тимідин) і тримали в інкубаторі при 37°С в

атмосфері з 5% CO_2. Для експериментів клітини висівали на скляні покрівні скельця за 48 год до експериментів.

Препарат аорти. Грудну аорту вирізали, вміщували у фізіологічний розчин, очищали і розрізали на сегменти (2 – 3) мм під стереомікроскопом. Один з сегментів розрізали і закріплювали ендотеліальною стороною догори в камері запису. Фармацевтичні агенти застосовували до препарату шляхом додавання до середовища. Досліди проводили при кімнатній температурі.

Виділення фракцій мітохондрій з міокарда щурів. Дві субпопуляції мітохондрій серця виділяли відповідно до методу, описаного Palmer (1977). Всі розчини мали температуру 2°С. Серця промивались 0,9%-м розчином KCl та подрібнювали в буфері **А** (містив, у мМ: сахарозу – 250; Tris-HCl – 20, pH 7,2), який містив 1 мМ ЕГТА, 0,5% БСА. Подрібнену тканину гомогенізували тефлоновим гомогенізатором. Гомогенат центрифугували при 700g та 2°С; з супернатанту виділяли субсарколемальні мітохондрії, використовуючи диференційне центрифугування при 7000 g та 2°С. Осад, що залишився, ресуспендували в буфері А, обробляли Nagarse в концентрації 2,5 мг/г тканини і гомогенізували. Гомогенат розводили вдвічі буфером А, і з суспензії виділяли інтерфібрилярні мітохондрії диференційним центрифугуванням.

Реєстрація поглинання кисню ізольованими мітохондріями. Поглинання кисню мітохондріями вивчали з використанням закритого електрода Кларка та прилада «Оксиграф» («Hansatech», Велика Британія). Середовище інкубації містило (мМ: KCl – 120, тріс-HCl – 10, KH_2PO_4 – 10; pH 7,2). В якості субстрату окиснення використовували 10 мМ розчин сукцинату натрію. Активне дихання ізольованих мітохондрій ініціювали додаванням 400 мкМ АДФ. Обсяг камери дорівнював 1 мл.

За отриманими записами обчислювали наступні параметри дихання мітохондрій: стан дихання у відносному спокої (МС-2), швидкість фосфорилюючого (МС-3, за Чансом) та контрольованого (МС-4) дихання мітохондрій, дихальний контроль (ДК), за Чансом (МС-3/МС-4), [Chance, 1956] та коефіцієнт ефективності фосфорилювання АДФ/О. Швидкість споживання кисню наведена нижче в нмоль $O_2 \cdot хв^{-1} \cdot мг^{-1}$ білку. Концентрація білка, яку визначали за методом Бредфорд, становила 1 мг/мл.

Спектрофотометрична реєстрація набуханя мітохондрій. Пошкодження мітохондрій реєстрували як циклоспорин А-чутливе набухання при дії $CaCl_2$ у високих концентраціях (кінцева концентрація 10^{-4} М). Мітохондрії вміщували в інкубаційне ізотонічне середовище (**буфер Б)** і реєстрували зниження оптичної щільності суспензії мітохондрій при λ=520 нм протягом 10 хв. Розчин $CaCl_2$ додавали на 5-й хвилині інкубації. Концентрація білка становила 0,1 мг/мл. Зміни оптичної щільності мітохондрій на останній хвилині набухання після дії на них індуктору МППП виражали як відношення до величини оптичної щільності на 1-й хвилині набухання.

Електрофізіологічні вимірювання. Скляні мікроелектроди виготовлювали з боросилікатного скла (зовнішній діаметр трубочок 1,5 мм).

При проведенні дослідів **розділу 3** опір піпеток становив 7 – 10 МОм. Піпеточний розчин містив (мМ): KCl – 140, HEPES – 10, ЕГТА – 5. Концентрацію

вільного Ca^{2+} доводили до 10 мкМ додаванням 4,93 мМ $CaCl_2$. Склад зовнішнього розчину був аналогічним піпеточному.

При проведенні дослідів **розділу 5** клітини EA.hy926 суперфузували зовнішньоклітинним розчином, що вміщував (у мМ): NaCl – 140; KCl – 5; $MgCl_2$ – 1,2; HEPES – 10; глюкози – 10; $CaCl_2$ – 2,4. Для реєстрації струмів в конфігурації «whole-cell», розчин піпетки вміщував (у мМ): K-аспартату – 100; KCl – 40; $MgCl_2$ – 1; HEPES – 10; ЕГТА – 5; концентрацію вільного Ca^{2+} доводили до 100 нМ додаванням 1,924 мМ $CaCl_2$ (розрахунок за програмою CaBuf). Опір піпеток становив 3 – 5 МОм.

Активність поодиноких каналів реєстрували в конфігурації «inside-out» в симетричних за калієм розчинах. Піпетки заповнювали розчином наступного складу (мМ): KCl – 140; HEPES – 10; $MgCl_2$ – 1; ЕГТА – 5. Концентрацію вільного Ca^{2+} доводили до 10 мкМ шляхом додавання 4,931 мМ $CaCl_2$; pH доводили до 7,2 додаванням KOH. Опір піпеток складав 5 – 7 МОм. Після утворення гігаомного контакту зовнішньоклітинний розчин перемикали на розчин наступного складу (мМ): KCl – 140; HEPES – 10; $MgCl_2$ – 1; ЕГТА – 5 і 0,3 мкМ (та інші бажані концентрації) вільного Ca^{2+}, які доводили шляхом додавання різних кількостей $CaCl_2$; pH доводили до 7,2 додаванням KOH. Холестерин видаляли з мембран шляхом попередньої інкубації клітин з 0,5% метил-β-циклодекстрином (МЦД) при 37°C протягом 1 год.

В **розділі 6** мембранний потенціал ендотеліальних клітин ізольованої аорти миші вимірювали, використовуючи метод «perforated patch-clamp» в режимі фіксації струму [Bondarenko, 2004]. В якості перфоруючого агенту застосовували ністатин. Піпетки заповнювали розчином, який вміщував (мМ): KCl – 145; ЕГТА – 0,3; HEPES – 10; pH доводили до 7,2 за допомогою KOH.

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

Статистичний аналіз числових даних. Експериментальні данні представленні нижче як середні значення ± похибка середнього (s.e.m). Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента (парного або непарного у відповідних випадках); при між групових порівняннях значення $P<0,05$ розглядали як показник достовірності різниць. В експериментах з клітинами EA.hy926, n вказує число досліджених клітин. В дослідах на інтактних ендотеліальних клітинах з ізольованих мишачих аорт, n вказує число тварин.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. ВПЛИВ ОМЕГА-3 ПНЖК НА ВЛАСТИВОСТІ МІТОХОНДРІЙ МІОКАРДА

Результати наших досліджень показали, що в контрольній групі щурів інтерфібрилярні та субсарколемальні мітохондрії міокарда проявляють практично

однакову чутливість до кальцію. Так, в безкальцієвому середовищі хід зниження світлопоглинання (що відповідає набуханню мітохондрій) майже не відрізнявся у субсарколемальній та інтерфібрилярній фракціях контрольної групи (0,81 ± 0,01 та 0,80 ± 0,02 на 15 хв відповідно) (**табл. 1**). Також виявилося, що за відсутності іонів Ca^{2+} субсарколемальні мітохондрії контрольної та експериментальної груп не демонстрували суттєвої різниці у перебігу набухання (**табл. 1**).

Таблиця 1. Набухання субсарколемальних та інтерфібрилярних мітохондрій міокарда у контрольній групі щурів та у щурів, що вживали омега-3 ПНЖК-збагачену дієту.

Фракції мітохондрій	Середня оптична щільність суспензії мітохондрій, D_{520}	
	середовище без Ca^{2+}	середовище з додаванням Ca^{2+}
субсарколемальна контрольна	0,81±0,01	0,63 ± 0,05
субсарколемальна + омега-3 ПНЖК	0,81±0,01	0,71±0,06*
інтерфібрилярна контрольна	0,80±0,02	0,65 ± 0,06
Інтерфібрилярна + омега-3 ПНЖК	0,91±0,02 *#	0,83 ± 0,01*#

Примітка: * P<0,05 у порівнянні з контрольною групою; # P<0,05 у порівнянні з субсарколемальними мітохондріями + омега-3 ПНЖК

На відміну від цього, споживання тваринами омега-3 ПНЖК в інтерфібрилярній фракції мітохондрій, зумовлювало помітне зменшення набухання мітохондрій в безкальцієвому середовищі (на 13,75%; зниження світлопоглинання до 0,91 ± 0,02) порівняно з таким у контрольній групі (0,80 ± 0,02; P<0,05) (**табл. 1**). Іншими словами, омега-3 ПНЖК істотно попереджують набухання інтерфібрилярної фракції мітохондрій на відміну від субсарколемальних мітохондрій. Після додавання 100 мкМ $CaCl_2$ величина набухання мітохондрій збільшувалась як у субсарколемальній (до 0,63 ± 0,05), так і в інтерфібрилярній (до 0,65 ± 0,06) фракціях контрольної групи.

Після тривалого вживання щурами омега-3 ПНЖК реакція субсарколемальних мітохондрій на додавання Ca^{2+} була меншою (в середньому на 12,6%) порівняно з такою в контрольній групі щурів (**табл. 1**). Після згаданого споживання щурами препарату омега-3 ПНЖК величина набухання інтерфібрилярної фракції мітохондрій у відповідь на додавання Ca^{2+} була на 27,6% меншою ніж в мітохондріях, видилених з сердець контрольної групи щурів (**табл.1**).

Слід зазначити, що інтерфібрилярна фракція мітохондрій виявилася менш чутливою до кальційіндукованого набухання, ніж субсарколемальна фракції мітохондрій внаслідок вживання омега-3 ПНЖК-збагаченої дієти. Так, показник набухання інтерфібрилярної фракції мітохондрій був на 16,9 % нижчим ніж субсарколемальної, що вказує на зменшену чутливість до перенавантаження Ca^{2+} інтерфібрилярної фракції після вживання омега-3 ПНЖК.

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

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

Результати досліджень, проведених на ізольованих мітохондріях міокарда щурів (опис тварин та схема експерименту наведені в розділі **Матеріали та методи досліджень**) продемонстрували, що ізопротереноліндуковане ураження міокарда, призводить до порушення мітохондріального дихання внаслідок перенавантаження кардіоміоцитів та мітохондрій іонами кальція (**табл. 2.**).

Таблиця 2. Показники дихання мітохондрій міокарда при ізопротеренол-індукованому пошкодженні міокарда в різних функціональних станах

Показники	Контроль (I група)	Ізопротеренол (II група)	Ізопротеренол та омега-3 ПНЖК (III група)
Швидкість поглинання кисню у стані			
відносного спокою (МС-2)	103,85±11,37	63±6,28*	88,12±8,2**
фосфорилюючого (МС-3)	228,85±19,26	117,71 ± 10,63*	200,25± 26,81**
контрольованого (МС-4, нмоль $O_2 \cdot хв^{-1} \cdot мг^{-1}$ білка)	43,14±4,36	38,71± 4,47	38,71 ±6,98
Дихальний контроль (МС-3/МС-4)	5,41±0,32	3,54± 0,22*	5,14 ±0,3**
Коефіцієнт ефективності фосфорилювання (АДФ/О)	1,59 ± 0,04	1,39± 0,05*	1,65± 0,05**

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

Так, в умовах окиснення сукцинату швидкість дихання, стимульована АДФ (у МС-3), знижувалась у середньому на 48,56% (в групі II). Відношення АДФ/О достовірно зменшилось на 14,46%, а швидкість субстратного дихання у МС-2 на 39,33% порівняно з контролем. Швидкість дихання після фосфорилювання АДФ (в МС-4) при ізопротереноловому ураженні не змінилась.

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

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

При порівнянні результатів, отриманих щодо ІФМ- та ССМ-фракцій, спостерігалась достовірна зміна світлопоглинання при 520 нм за відсутності індуктора відкривання МППП Ca^{2+}. Контрольне значення ΔD змінювалось від 0,06 ± 0,01 в контрольній групі до 0,31 ± 0,03 в групі II для СС- (**рис.1. записи 1** та **5**) та від 0,08 ± 0,01 в контролі до 0,29 ± 0,03 в групі II для ІФ-фракцій (**рис.1. записи 3** та **6**).

Вірогідної різниці між СС- та ІФ- фракціями при ізопротереноліндукованому пошкодженні в наших дослідах, проте, виявлено не було (**рис.1. записи 5** та **6**). Варто зазначити, що те зниження оптичної щільності, яке спостерігали при ізопротереноліндукованому пошкодженні міокарда, було подібне до такого при дії високих концентраціях кальцію. В умовах навантаження контрольних мітохондрій кальцієм відбувалося зниження світлорозсіювання до показників ΔD 0,33 ± 0,05 для СС- та 0,37 ± 0,66 для ІФ-мітохондрій (**рис.1. записи 2** та **4**).

Наступним завданням роботи було з´ясувати, чи здійснюють захисний вплив омега-3 ПНЖК на мітохондрії міокарда при ізопротереноліндукованому пошкодженні, а також чи залежить інтенсивність можливого ефекту від різновиду фракції мітохондрій. Виявилося, що після попереднього тривалого споживання омега-3 ПНЖК ізопротереноліндуковане пошкодження міокарда супроводжується менш інтенсивним кальційнезалежним набуханням мітохондрій групи III (на 54,84% для СС- та на 65,52% для ІФ-фракції у порівнянні з групою II. Значення D знижувалось в середньому з 0,31 ± 0,03 до 0,14 ± 0,02 для ССМ (**рис. 1. записи 5** та **7**) та з 0,29 ± 0,03 до 0,11 ± 0,03 для ІФМ відповідно (**рис. 1. записи 6** та **8**).

Отже, після тривалогоспоживання омега-3 ПНЖК інтерфібрилярна фракція менш чутлива до набухання у відповідь на додавання кальцію порівняно з аналогічним феноменом субсарколемальної фракцієї мітохондрій в умовах ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда.

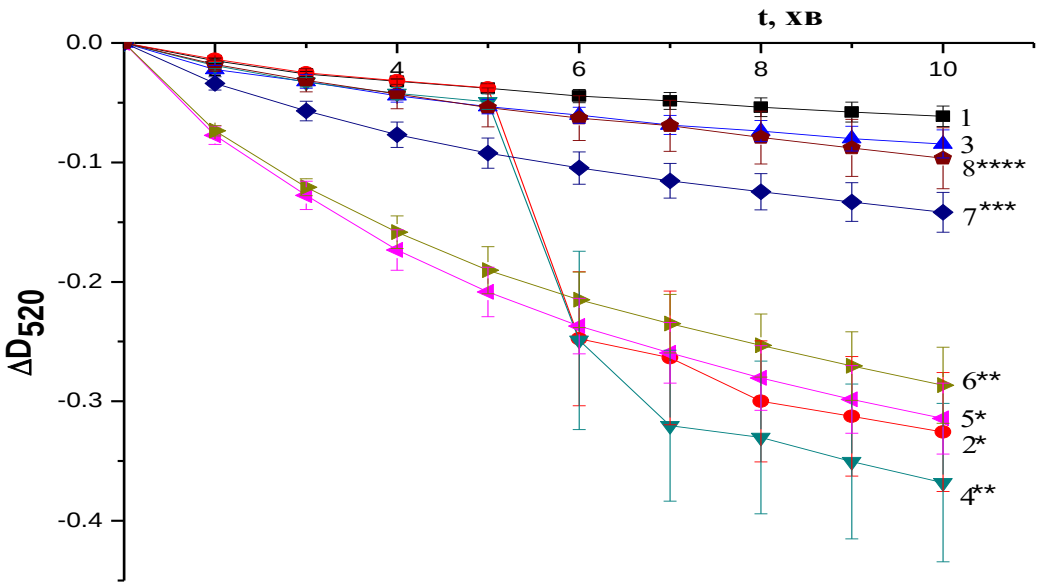

Рис. 1. *Світлорозсіювання суспензії мітохондрій виділених з контрольних та експериментальних сердець тварин: вісь ординат – різниця показників оптичної щільності між n-ю хвилиною та 1-ю, вісь абсцис – час, хв.:* ***1*** *– субсарколемальні мітохондрії (ССМ), контроль;* ***2*** *– ССМ, контроль, додавання кальцію (10^{-4} М) на 5-й хв;* ***3*** *– інтерфібрилярні мітохондрії (ІФМ), контроль;* ***4*** *– ІФМ, контроль, СІ з високим вмістом кальцію;* ***5*** *– ССМ, група з ізопротереноліндукованим (ІІ) пошкодженням міокарда;* ***6*** *– ІФМ, група з ІІ пошкодженням міокарда,* ***7*** *– ССМ, група з ІІ пошкодженням міокарда за впливу омега-3 ПНЖК;* ***8*** *– ІФМ, група з ІІ пошкодженням міокарда за впливу омега-3 ПНЖК; * P<0,05 у порівняннях з групою 1, ** – P<0,05 у порівняннях з групою 3, *** – P<0,05 у порівняннях з групою 5, **** – P<0,05 у порівняннях з групою 6.*

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

Для подальшого дослідження мітохондріальних механізмів, у кардіопротекторної дії омега-3 ПНЖК, ми провели серію експериментів на ізольованих мітопластах з метою виявлення впливу омега-3 ПНЖК на електричну активність внутрішньої мембрани мітохондрій HL-1-клітин; останні є клітинно лінією кардіоміоцитів мишачого походження. Застосування конфігурації mitoplast - attached до ізольованих мітопластів в симетричних за калієм (150 мМ) розчинах дозволило виявити струми через поодинокі канали великої провідності (~300 пС). При збільшенні значень підтримуваного потенціалу від +20 до +80 мВ, активність каналу збільшувалася (**рис. 2. А**), що свідчить про потеціалзалежність його функції. Суперфузія мітопластів розчином, що вміщував 1,0 мМ ЕГТА без додавання Ca^{2+},

призводила до пригнічення поодинокої активності. Цей факт свідчить про те, що активність каналу є залежною від присутності Ca^{2+} в зовнішньому розчині.

Додавання такого представника омега-3 ПНЖК, як докозагексаєнової кислоти, до ізольованих мітопластів зумовлювало потенціацію активності поодиноких ВКСа-каналів при фіксованих рівнях потенціалу і концентрації кальцію без суттєвих змін амплітуди струмів через канали. Додавання 1,0 мкМ паксиліну — селективного інгібітора ВКСа-каналів — призводило до пригнічення активності таких каналів (**рис. 2. Б**).

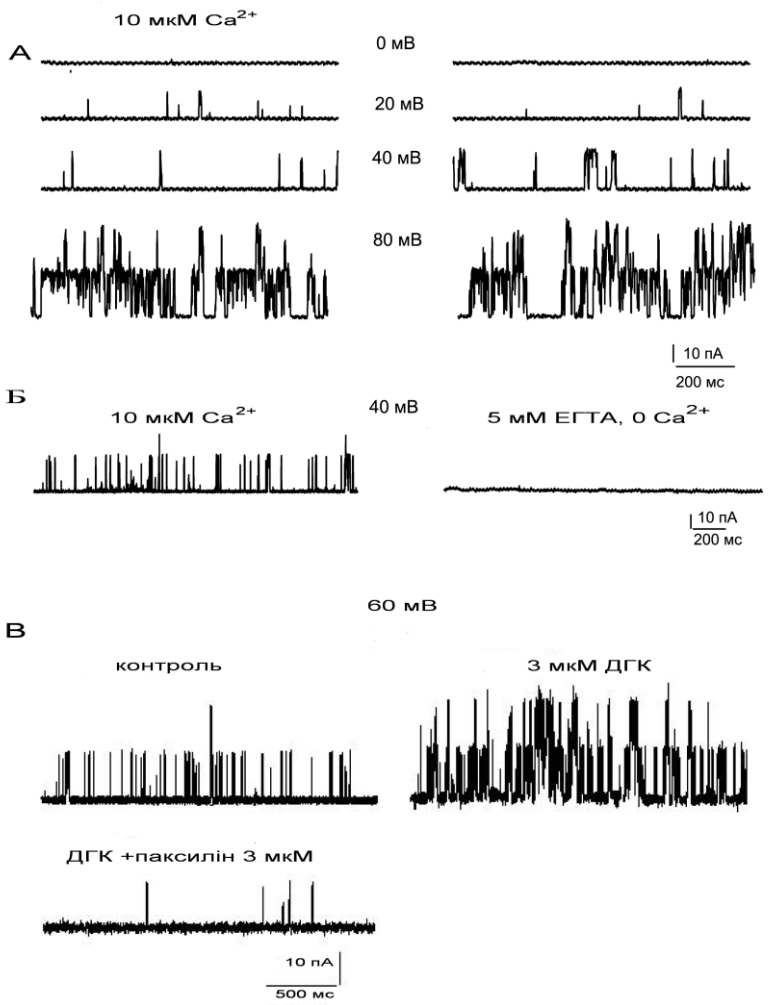

Рис. 2. *Збільшення активності ВКСа-каналів внутрішньої мембрани мітохондрій кардіальних клітин Hl-1.* ***А*** *– Оригінальні записи струмів через ВКСа-канали внутрішньої мітохондріальної мембрани HL-1 клітин при різних підтримуваних потенціалах. Конфігурація «mitoplast-attached». Активність каналу збільшується при збільшенні значень потенціалу фіксації від +20 до +80 мВ, що свідчить про потеціалзалежність функції каналу.* ***Б*** *– Оригінальні записи струмів через вказані канали внутрішньої мітохондріальної мембрани в присутності 10 мкМ Ca^{2+}. та після хелатування Ca^{2+}. Підтримуваний потенціал +40 мВ.* ***В*** *– Оригінальні записи струмів через ВКСа-канали внутрішньої мітохондріальної*

мембрани в контрольних умовах (контр.) та після додавання у розчин 3 мкМ ДГК (праворуч) та ДГК в комбінації з паксиліном (знизу).

Таким чином, отримані результати дозволили ідентифікувати функціональну активність ВКСа-каналів у внутрішній мембрані мітохондрій кардіальних клітин і продемонструвати, що омега-3 ПНЖК здійснюють прямий потенціюючий вплив на активність таких каналів.

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

Ми припустили, що захисний вплив омега-3 ПНЖК проти Ca^{2+}-індукованого пошкодження мітохондрій опосередкований дією на ВКСа-канали. Для порівняння дії цих двох факторів (омега-3 ПНЖК та ВКСа-каналів) на параметри дихання мітохондрій при Ca^{2+}-ПНВ (10 мкМ) було досліджено 1) можливість захисної дії активатору ВКСа-каналів NS1619 (30 мкМ) та можливість усунення цього ефекту блокатором ВКСа-каналів паксиліном (1,0 мкМ); 2) усунення блокатором ВКСа-каналів паксиліном (1,0 мкМ) захисної дії омега-3 ПНЖК.

У цих аспектах були отримані наступні результати, наведені в **табл.3.** Кальцій (10 мкМ) в наших дослідах достовірно знижував швидкість дихання в МС-3 та підвищував швидкість дихання в МС-4 порівняно з контролем. ДК в цьому разі достовірно знижувався, але відношення АДФ/О не змінювалось порівняно з контролем. Активатор ВКСа-каналів NS1619 підвищував швидкість в МС-2 та МС-4 та зменшував ДК порівняно з контролем. Швидкість дихання в МС-3 в наших дослідах не змінювалась. При комбінованій дії активатору ВКСа-каналів та Ca^{2+} NS1619 не попереджав негативний вплив кальцію на швидкість дихання в МС-3, але блокував дію кальцію при МС-4 та, відповідно, ДК. Додавання докозагексаєнової кислоти (ДГК, 3,0 мкМ), тобто представника омега-3 ПНЖК, в наших дослідах зменшувало швидкість дихання в МС-3 та значення ДК; при цьому швидкість дихання в МС-4 та відношення АДФ/О не змінювалось. Одночасна дія омега-3 ПНЖК та кальцію (10 мкМ) попереджувала зменшення швидкості дихання в МС-3 та ДК та не допускала зростання швидкості дихання в МС-4. Інгібітор ВКСа-каналів паксилін (1,0 мкМ) не попереджував зменшення швидкості дихання в МС-3 **(**у відповідь на дію Ca^{2+} за наявності NS1619), але відміняв захисний вплив NS1619 при МС-4 та дію на ДК.

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

При цьому, проте, спостережувані ефекти демонстрували і певні відмінності. Тільки ДГК попереджувала зменшення швидкості дихання в МС-3 при Са-ПНВ, але

не NS1619; при МС-4 паксилін відміняв захисну дію NS1619 при Са-ПНВ, але не ДГК; паксилін знизив відношення АДФ/О за умов впливу NS1619 при Са-ПНВ, але не при ДГК.

Таблиця 3. Показники дихання мітохондрій міокарда при кальцієвому перенавантаженні у різних функціональних станах та в умовах впливів активатора ВКСа-каналів та ДГК

	Швидкість споживання кисню без АДФ, нмоль O_2·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білка (V2)	Швидкість фосфорилюючого дихання мітохондрій (у метаболічному стані 3), нмоль O_2·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білка (V3)	Швидкість контрольованого дихання мітохондрій (в метаболічному стані 4), нмоль O_2· хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білка (V4)	Коефіцієнт дихального контролю, за Чансом	Коефіцієнт ефективності фосфорилювання (АДФ/О)
Вихідний стан	44,19±2,24	99,79 ±6,82	22,26±1,5	4,54±0,2	1,78±0,02
Кальцій, 10^{-5}М	40,33±4,31	79,58±3,87	35,08±4,96	2,58±0,21	1,75±0,01
NS1619, $30\cdot10^{-6}$М	53,18±4.38	85,1±7,31	31,3±5,82	2,69±0,28	1,72±0,01
NS1619 за наявності 10^{-5} М Ca^{2+}	48,18±6,78	73,25±10,98	17,87±1,27	3,61±0,41	1,74±0,01
Дія паксиліну за наявності NS1619 та 10^{-5} М Ca^{2+}	49,62±2,49	68,87±6,12	35±5,82	2,11±0,17	1,05±0,05
ДГК, $3\cdot10^{-6}$ М	34,25±4,83	61,75±5,29	23,5±4,23	3,2±0,35	1,78±0,02
Дія ДГК ($3\cdot10^{-6}$ М) за наявності 10^{-5} М Ca^{2+}	39,09±3,65	58±3,69	28,78±4,41	3,35±0,31	1,76±0,02

5. НАЯВНІСТЬ МЕМБРАННОГО ХОЛЕСТЕРИНУ ЗАБЕЗПЕЧУЄ СТИМУЛЮЮЧИЙ ВПЛИВ ОМЕГА-3 ПНЖК НА АКТИВНІСТЬ ВКСа-КАНАЛІВ

5.1. Під дією докозагексаєнової кислоти ендотеліальні клітини гіперполяризуються завдяки стимуляції ВКСа-каналів

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

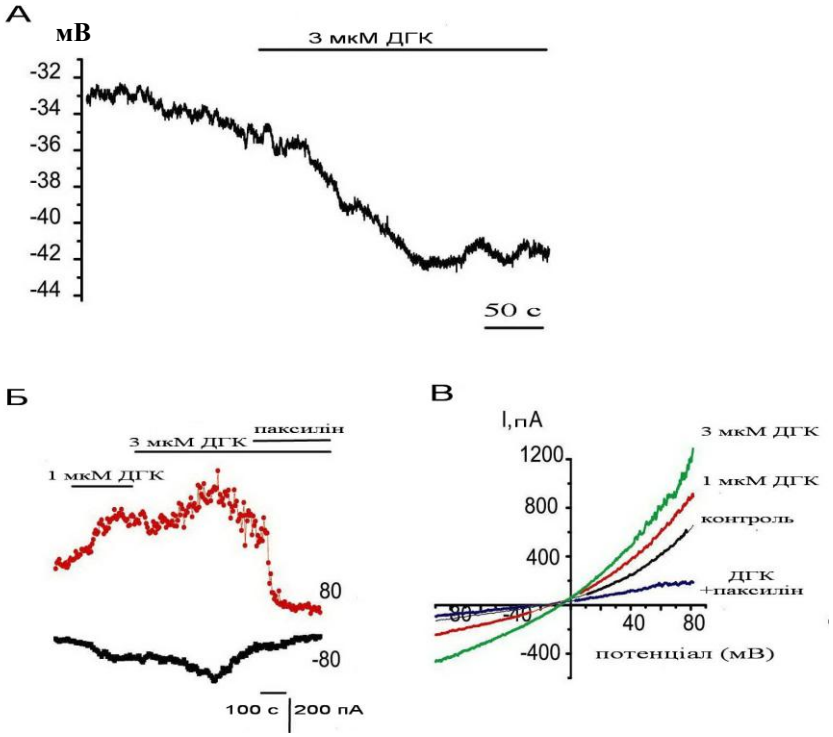

Рис. 3. *Впливи ДГК на електричну відповідь ендотеліальних клітин EA.hy926.* ***А.*** *– ефект ДГК (3,0 мкМ) щодо мембранного потенціала ендотеліальних клітин.* ***Б, В.*** *мембранні струми в конфігурації «whole cell» (n=5), викликані рамповими змінами напруги до (контроль) та після застосування 1,0 або 3,0 мкМ ДГК самостійно або в комбінації з 2,0 мкМ паксиліну*

5.2. Стимулюючий ефект ДГК на функцію ВКСа-каналів детермінується наявністю мембранного холестерина

Рецепторнезалежний вплив ДГК на функцію ВКСа-каналів може бути як наслідком прямої взаємодії молекул ДГК із структурними компонентами ВКСа-каналу, так і результатом змін біофізичних властивостей ліпідного бішару мембрани. В пошуках механізму, завдяки якому ДГК активує ВКСа-канали, ми дослідили, чи спроможна ДГК активувати ВКСа-канали після руйнування ліпідних рафтів (за допомогою преінкубації клітин у розчині, що містить 0,5 мМ МЦД). Мембранний холестерин є важливим регулятором активності іонних каналів, включаючи і ВКСа-канали [Bukiya, 2011]. Після одногодинної преінкубації клітин у розчині, що містив 0,5 МЦД, ДГК не могла стимулювати активність ВКСа-каналів (n=5). Ці експерименти дозволяють дійти висновку, що ДГК сприяє активності ВКСа-каналів через модифікацію ліпідних рафтів, а не через пряму взаємодію з білками каналу.

6. ПОДВІЙНИЙ ВПЛИВ ЛІЗОФОСФАТИДИЛІНОЗИТОЛУ ТА ЛІЗОФОСФАТИДИЛХОЛІНУ НА ЕЛЕКТРИЧНУ ВІДПОВІДЬ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН

6.1. Лізофосфатидилхолін викликає гіперполяризацію ендотеліальних клітин внаслідок активації ВКСа-каналів

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

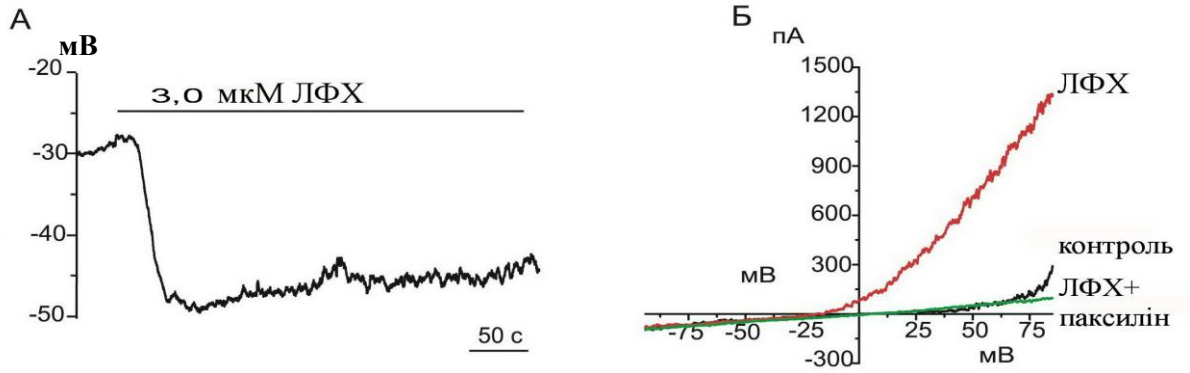

Рис. 4. *Гіперполяризація ендотеліальних клітин лінії EA.hy926 і активація ВКСа-каналів під впливом ЛФК.* ***А****. Вплив 3,0 мкМ ЛФХ на мембранний потенціал ЕК.* ***Б****. Калієві струми в конфігурації «whole cell» у відповідь на рампові зміни напруги від - -80 до +80 мВ за відсутності (контроль) і наявності 3,0 мкМ ЛФХ і комбінованої присутності 3,0 мкМ ЛФХ і 1,0 мкМ паксиліну.*

Щоб з'ясувати, чи вимагає підсилення ВКСа струмів під дією ЛФХ змін в цитозольній концентрації кальцію, активність поодиноких ВКСа-каналів була зареєстрована при фіксованій концентрації Ca^{2+}. В присутності 0,3 мкМ Ca^{2+} в розчині ванночки, ЛФХ, аплікований до внутрішньої поверхні ділянки петчу, активував поодинокі ВКСа-канали. Ступінь активації не відрізнявся в діапазоні значень потенціалів від 20 до 70 мВ, вказуючи на те, що активація відбувається потенціалнезалежним чином. Так, при фіксованому потенціалі 40 мВ і концентрації вільного Ca^{2+} 0,3 мкМ додавання 3,0 мкМ ЛФХ призводило до зростання середнього значення NP_o від 0,017 ± 0,001 до 0,028 ± 0,001 (n=9).

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

На клітинах EA.hy926 спершу тестували чутливість стійкої гіперполяризації, викликаної аплікацією 100 мкМ гістаміну, до ЛФІ та ЛФХ. Коли 10 мкМ ЛФІ було застосовано під час плато-фази гіперполяризації (27,8 ± 2,2 мВ, n=5), остання повністю усувалась (n=5) (**рис.5. А** та **Б**). Гіперполяризація відновлювалася при відмиванні ЛФІ. Подібно до ЛФІ, ЛФХ (10 мкМ), застосований на плато-фазі гіперполяризації, повністю усував гіпероляризаційну відповідь протягом 3 хв (**рис. 5. В** та **Г**).

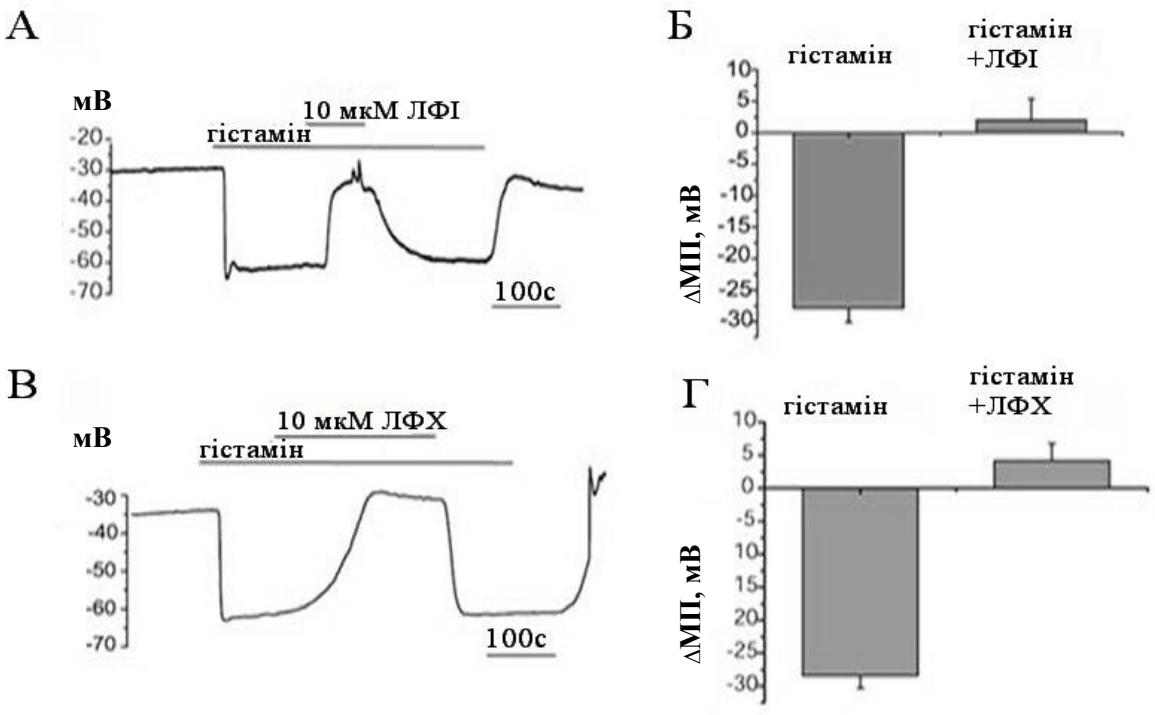

Рис. 5. *Пригнічення гістамініндукованої гіперполяризації клітин EA.hy926 під дією ЛФІ та ЛФХ.* ***А.*** *Запис мембранного потенціалу показує, що 10 мкМ ЛФХ усуває тривалу гіперполяризацію, вкликану аплікацією на 100 мкМ гістаміну;* ***Б.*** *Діаграма середніх значень амплітуди змін мембранного потенціалу під дією гістаміну до і після аплікації 10 мкМ ЛФХ;* ***В.*** *Запис мембранного потенціалу, що*

показує вплив ЛФІ на гіперполяризацію, викликану дією 100 мкМ гістаміну; ***Г.*** *Середні значення амплітуди змін мембранного потенціалу при дії гістаміну до і після додавання 10 мкМ ЛФІ.*

Гіперполяризація не зберігалася в умовах постійної присутності ЛФХ та гістаміну, але відновлювалася при відмиванні ЛФХ. Ці факти вказують на те, що і ЛФІ і ЛФХ діють як потужні інгібітори гістамініндукованої гіперполяризації ЕК; вони узгоджуються з результатами попередніх досліджень щодо зменшення пригнічення рівня внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} [Miwa, 1997] та розвитку ендотелійзалежної гіперполяризації [Eizawa, 1995] на ацетилхолін, викликане ЛФХ та ЛФІ.

ВИСНОВКИ

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

1. Споживання омега-3 ПНЖК захищає інтерфібрилярну та субсарколемальну фракції мітохондрій міокарда щурів при навантаженні кальцієм, причому захисний ефект більш виражений щодо інтерфібрилярної фракції.

2. В умовах ізопротереноліндукованого пошкодження міокарда середні величини набухання мітохондрій інтерфібрилярної та субсарколемальної фракцій міокарда щурів в безкальцієвому середовищі не розрізняються, що свідчить про однакову ступінь пошкодження цих субклітинних структур.

3. При експериментальному ізопротереноліндукованому пошкодженні міокарда тривале споживання омега-3 ПНЖК щурами призводить до нормалізації кінетики набухання мітохондрій в безкальцієвому середовищі. Захисний ефект є більш вираженим для інтерфібрилярної фракції. Споживання омега-3 ПНЖК частково, але істотно усуває ізопротереноліндуковані негативні зміни показників дихання мітохондрій (при стані дихання 3, показник дихального контролю та коефіцієнт АДФ/О).

4. Активація ВКСа-каналів мітохондрій серця при дії докозагексаєнової кислоти запобігає зростанню швидкості дихання в мітохондріальному стані 4 та зниження дихального контролю мітохондрій при перенавантаженні мітохондрій кальцієм.

5. Аплікація докозагексаєнової кислоти безпосередньо потенціює активність ВКСа-каналів мітохондрій серця та ендотеліальних клітин, зумовлюючи гіперполяризацію останніх.

6. Наявність мембранного холестерину є критичним фактором у сигнальному шляху омега-3 ПНЖК – ВКСа-канали.

7. Лізофосфотидилхолін та лізофосфатидилінозитол здатні безпосередньо потенціювати активність ВКСа-каналів ендотеліальних клітин.

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

Статті у фахових виданнях

1. **Panasiuk O**, Shysh A, Bondarenko A. Omega-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet differentially protects two subpopulations of myocardial mitochondria against Ca^{2+}-induced injury. Experimental & Clinical Cardiology. 2013; 18(1):e60. *(Особистий внесок здобувачки: особисто налагоджено метод виділення двух мітохондріальних фракцій міокардіальних клітин і проведено виділення мітохондрій для подальших експериментів, проведення всіх експериментальних досліджень, статистична обробка результатів, участь в плануванні дослідів та в підготовці матеріалів статті до публікації)*
2. **Panasiuk OS**, Shysh AM, Moĭbenko OO. The influence of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on functional parameters of myocardial mitochondria during isoproterenol-induced heart injury. Fiziolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine). 2014; 60(1):18-24. *(Особистий внесок здобувачки: проведення експериментальних досліджень, статистичної обробки результатів дослідження, участь в підготовці матеріалів статті до публікації)*
3. **Panasiuk O**, Bondarenko AI. Membrane cholesterol determines the stimulatory effect of omega-3 PUFA on BK channel activity. Pharmacologia. 2015;6(1):31-37. *(Особистий внесок здобувачки: виконано частину експериментальних досліджень, участь в обговоренні та написанні статті)*
4. **Панасюк ОС**, Шиш АМ, Мойбенко ОО. Омега-3 поліненасичені жирні кислоти нормалізують функцію мітохондрій, ферментів про- та антиоксидантної системи та експресію цитохрому Р450 2Е1 при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця. Фізіол. журн. 2016;62(2):64-71. *(Особистий внесок здобувачки: виконано експериментальну частину на мітохондріях, участь в підготовці матеріалів до друку і написанні статті)*
5. Bondarenko A, Montecucco F, **Panasiuk O**, Sagach V, Sidoryak N, Brandt KJ, Mach F. GPR55 agonist lysophosphatidylinositol and lysophosphatidylcholine inhibit endothelial cell hyperpolarization via GPR-independent suppression of Na^{+}-Ca^{2+} exchanger and endoplasmic reticulum Ca^{2+} refilling. Vascular pharmacology. 2017/2/28;89:39-48. *(Особистий внесок здобувачки: виконано частину експериментальних досліджень, участь у підготовці матеріалів до друку)*
6. **О.С. Панасюк**, О.І. Бондаренко. Участь кальційзалежних калієвих каналів великої провідності в модуляції параметрів дихання мітохондрій міокарда докозагексаєновою кислотою. Фізіол. журн. 2020;66(6): 74-81. *(Особистий*

внесок здобувачки: виконано частину експериментальних досліджень, участь у підготовці матеріалів до друку і написанні статті)

Додаткові роботи, у яких висвітлено результати дисертації

7. Panasiuk OS, Shysh AM, Moibenko OO. Effects of dietary ω-3 polyunsaturated fatty acids on myocardial mitochondria functioning under isoproterenol-induced heart damage. International Journal of Physiology and Pathophysiology. 2015;6(1) *(Особистий внесок здобувачки: проведення експериментальних досліджень, статистичної обробки результатів дослідження, участь в підготовці матеріалів статті до публікації)*

8. Panasiuk OS, Shysh AM, Dosenko VE, Moibenko OO. Omega-3 polyunsaturated fatty acids normalize the functions of mitochondria, pro-and antioxidant enzymes of, and cytochrome P450 2e1 expression after isoproterenol-induced myocardial injury. International Journal of Physiology and Pathophysiology. 2017;8(2) *(Особистий внесок здобувачки: виконано експериментальну частину на мітохондріях, участь в підготовці матеріалів до друку)*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Panasiuk O**, Moybenko O. Different sensitivities of two mitochondrial subpopulations to calcium-induced injury after omega-3 PUFA feeding. 2nd International Graz symposium on lipid and membrane biology: focus on lipotoxicity. 2008 March 13-15; Graz, Austria. (*Публікація тез, участь у постерній сесії).*
2. **Panasiuk O**, Moybenko O. Interfibrillar mitochondria in ω-3 PUFA-fed rats exhibit a higher resistance to calcium than subsarcolemmal ones. J of Mol Cel Cardiol. 2008;44 (4):806 (*Публікація тез).*
3. **Панасюк ОС**, Шиш АМ, Мойбенко ОО. Омега-3 поліненасичені жирні кислоти попереджають набухання субсарколемальної та інтерфібрилярної фракцій мітохондрій міокарда. VI конг. патофізіол. України; 2012 3-5жовт., Місхор, Україна. Таврический медико-биологический вестник. 2012;15(3), Ч.1(59):254-256. (*Публікація тез).*
4. **Panasiuk O**. Different sensitivities of two mitochondrial subpopulations to calcium-induced injury. 2nd MiP summer school on mitochondrial respiratory physiology. 2008 July 12-18; Schröcken, Vorarlberg, Austria. (*Публікація тез).*
5. **Панасюк ОС**, Шиш АМ, Мойбенко ОО. Вплив омега-3 поліненасичених жирних кислот на показники функціонування мітохондрій міокарда при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця. Матер. VI пленуму наук. т-ва патофізіол. України та наук.-практ. конф. за участю міжнар. спеціалістів "Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології". 2014:71-73. (*Публікація тез).*
6. Bondarenko A, **Panasiuk O**, Okhai I, Brandt KJ, Montecucco F, Mach F. Alterations of IKCa-mediated endothelial electrical signaling in a murine model of atherosclerosis. European journal of clinical investigation. 2017/5/1 47;129-129. (*Публікація тез, участь у постерній сесії).*
7. Shysh A.M., **Panasiuk O.S.**, Maksymchuk O.V., Dosenko V.E. The influence of omega-3 polyunsaturater fatty acids on mitochondria swelling, enzymes of prooxidant-antioxidant system and expression of cytochrome P450 2E1 after

isoproterenol-induced myocardial injury // 5-й з'їзд Українського тов. клітинної біології з міжн. представництвом. 2-6 жовтня 2016. Одеса. - Р28. (*Публікація тез)*

АНОТАЦІЯ

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

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

Дисертація присвячена дослідженню впливу омега-3 поліненасичених жирних кислот (омега-3 ПНЖК) та лізофосфоліпідів (ЛФЛ) на функціональний стан мітохондрій міокарда та судиних ендотеліальних клітин та визначенню ендогенних механізмів, які обумовлюють кардіопротекторний вплив цих сполук.

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

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

Виявлено захисний вплив омега-3 ПНЖК при ізопротереноліндукованому пошкодженні серця. Зокрема, при реєстрації мітохондріального дихання було встановлено, що швидкість дихання в стані 3, дихальний контроль та ефективність фосфорилювання достовірно відновлювались у щурів з ізопротереноловим пошкодженням при застосуванні омега-3 ПНЖК. Підтверджено, що ін'єкції ізопротеренолу змінюють показники дихання мітохондрій при окисненні сукцинату; швидкість дихання в стані 4 за таких умов не змінювалась. Також відновлювалась здатність мітохондрій реагувати на додавання іонів кальцію при реєстрації світлопоглинання суспензії у групі з омега-3 ПНЖК.

Для з'ясування механізмів, що забезпечують захисну дію омега-3 ПНЖК на функцію міокарда і судин, було досліджено їх вплив на електричні властивості ізольованих мітохондрій та ендотеліальних клітин. В експериментах на ізольованих мітопластах за домомогою методу петч-кламп продемонстрована поодинока активність кальційзалежних калієвих каналів великої провідності (ВКСа) (~300 пС), яка підсилювалась після додавання 3 мкМ докозагексаєнової кислоти (ДГК) (ПНЖК класу омега-3). Амплітуда поодиноких каналів при цьому не змінювалась. Подальше додаваня паксиліну, селективного блокатора ВКСа каналів, та хелатування іонів Ca^{2+} в зовнішньому розчині призводило до значного пригнічення активності поодиноких каналів, що свідчить про залучення ВКСа каналів внутрішньої мітохондріальної мембрани в реалізацію ефекта ДГК.

Концентраційнозалежне підсилення активності поодиноких ВКСа каналів продемонстровано при додаванні ДГК до внутрішньої поверхні плазматичної мембрани ендотеліальних клітин лінії EA.hy926. Підсилення активності відбувалося при позитивних та негативних підтримуючих потенціалах. ДГК викликала гіперполяризацію ендотеліальних клітин, що свідчить про стимуляцію кальцій-залежних процесів, зокрема, до збільшення синтезу оксида азоту ендотеліальними клітинами. Після видалення мембранного холестерину за допомогою метилциклодекстрину, додавання ДГК не призводило до стимуляції активності ВКСа каналів.

Досліджено вплив складових фосфоліпідів на функціональну активність ВКСа каналів ендотеліальних клітин лінії EA.hy926. Продемонстровано, що лізофосфатидилхолін (ЛФХ) та лізофосфатидилінозитол (ЛФІ) мають пряму модулюючу дію на активність ВКСа каналів, гіперполяризуючи ендотеліальні клітини. Крім того, ЛФХ та ЛФІ пригнічують гіперполяризацію ендотеліальних клітин, індуковану дією ендотелійзалежних вазодилататорів гістаміна та ацетилхоліна. Такий ефект спостерігається за рахунок пригнічення натрій-кальцієвого обмінника.

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

SUMMARY

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

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

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

The differences in the effects of omega-3 PUFA therapy on the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening elicited by Ca^{2+} overload between the two functionally and structurally heterogeneous fractions of myocardial

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

The effect of omega-3 PUFA-enriched diet on the functioning of IF and SS fractions of rat myocardial mitochondria under isoproterenol-induced myocardial damage was also studied. It is shown that under such conditions, omega-3 PUFA-enriched diet prevents Ca^{2+}-induced mitochondria swelling, pointing for protective effect of omega-3 PUFA on isoproterenol-induced heart damage. This effect was found to be more pronounced for the IF mitochondrial fraction, When studying mitochondrial respiration, it was found that in mitochondria isolated from rats with isoproterenol-evoked myocardial damage, the respiration rate in state 3, the respiratory control and phosphorylation efficiency were significantly restored by omega-3 PUFA-enriched diet. Isoproterenol injections have been shown to result in altered mitochondrial respiration during succinate oxidation: respiration rate in state 4 under such conditions did not change significantly. The ability of mitochondria to respond to the addition of Ca^{2+} in the group with omega-3 PUFA was also restored.

To elucidate the mechanisms providing the protective effect of omega-3 PUFA on myocardial and vascular function, their effects on the electrical properties of isolated mitochondria and endothelial cells (EC) were investigated. In patch-clamp experiments on isolated mitoplasts (mitochondria without an outer membrane), single channel activity of Ca^{2+}-dependent potassium channels of big conductance (BKCa) was demonstrated. The channel activity was increased by the administration of 10^{-5} M docosahexaenoic acid (DHA), a member of omega-3 PUFA, to the external solution. Addition of paxilin, a selective blocker of BKCa channels, led to a significant inhibition of the channel activity, indicating the involvement of BKCa channels of the inner mitochondrial membrane in the effect of DHA.

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

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

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

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДГК — докозагексаєнова кислота

ІФМ — інтерфібрилярні мітохондрії

ІМ — інфаркт міокарда

ЖК — жирні кислоти

ЛФЛ — лізофосфоліпід

ЛФХ — лізофосфатидилхолін

ЛФІ — лізофосфоінозитол

МППП — мітохондріальна пора перемінної проникності

МЦД — метилциклодекстрин

ПНЖК — поліненасичені жирні кислоти

ССМ — субсарколемальні мітохондрії

ССЗ — серцево-судинні захворювання

ФЛ — фосфоліпіди

ВКСа — кальційзалежні калієві канали великої провідності