

С.В. Чорна, Н.А. Струтинська, О.М. Семенихіна, С.А. Таланов, А.В. Коцюрuba, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

Тривалі фізичні навантаження покращують скоротливу функцію серця у старих щурів за допомогою NO-залежного зменшення чутливості мітохондріальної пори до кальцію

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; E-mail: snizhana-chorna@inbox.ru

Досліджували вплив тривалих фізичних навантажень на показники функціонального стану ізолюваного за Лангендорфом серця старих щурів в умовах ішемії-реперфузії, чутливість кальційіндукованої мітохондріальної пори (МП), а також роль NO-залежних механізмів регуляції пороутворення. Так, реперфузійні порушення скоротливої функції міокарда і його кисневого обміну були менш виражені у старих щурів, адаптованих до фізичних навантажень, що свідчить про їх позитивний вплив. Показано зменшення чутливості МП до дії Ca^{2+} в серці старих тренуваних щурів внаслідок збільшення на 1,5–2 порядки порогової концентрації іона, яка індукувала набухання органел, порівняно з нетренованими тваринами. Разом з цим у мітохондріях серця тренуваних дорослих щурів спостерігали підвищення майже вдвічі активності конститутивної NO-синтази (eNOS) відносно контролю ($6,02 \pm 0,08$ і $3,64 \pm 0,27$ пмоль/хв · мг білка відповідно; $P \leq 0,05$) та незначне зростання активності індукбельної NOS (iNOS). У старих тренуваних тварин регуляція пороутворення здійснювалася за рахунок достовірного зниження активності iNOS відносно контролю старих щурів ($12,29 \pm 3,11$ і $9,25 \pm 1,24$ пмоль/хв · мг білка відповідно; $P \leq 0,05$) на тлі незначного зростання активності cNOS. В умовах зменшення продукції NO в мітохондріях шляхом одноразового введення тренуваним тваринам різного віку блокатора активності NOS L-NAME (10 мг/кг) було показано зростання чутливості МП до дії Ca^{2+} в серці, що вказує на роль оксиду азоту як інгібітора пороутворення при тренуваннях. За допомогою методу полімеразно-ланцюгової реакції у реальному часі встановлено, що рівень експресії мРНК гена eNOS у серці суттєво перевищує такий nNOS та iNOS. При цьому в серці дорослих тренуваних щурів рівень експресії мРНК nNOS підвищувався в 5 разів, мРНК iNOS – у 24 рази ($P < 0,05$), а рівень експресії eNOS знижувався у 3,5 раза порівняно з нетренованими. У серці старих тренуваних щурів рівень експресії мРНК nNOS знижувався в 4 рази ($P < 0,05$) та iNOS – 2 рази порівняно зі старими нетренованими тваринами. За умов тренування спостерігали відновлення рівня експресії мРНК eNOS до такого контрольних дорослих тварин. Таким чином, тривалі фізичні навантаження сприяли поліпшенню функціонального стану серця при старінні, а саме, його скорочувальної функції, а також підвищенню резистентності органа до оксидативного стресу за умов реперфузійних ушкоджень, що зумовлено зниженням чутливості МП до дії іонів кальцію в серці на тлі підвищення активності мітохондріальної cNOS та відновлення рівня експресії мРНК eNOS, які забезпечують синтез оксиду азоту – ендогенного інгібітора пороутворення.

Ключові слова: тренування фізичними навантаженнями, серце, ішемія-реперфузія, мітохондріальна пори, оксид азоту, експресія гена, старі щури.

ВСТУП

Відомо, що старіння супроводжується розладом фізіологічних функцій організму та

зменшенням його адаптивних можливостей до виживання. Відновити до деякої міри ці процеси можуть коригуючі довготривалі

© С.В. Чорна, Н.А. Струтинська, О.М. Семенихіна, С.А. Таланов, А.В. Коцюрuba, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач

впливи, наприклад фізичні навантаження, які успішно використовуються в комплексній перебудові організму для поліпшення стану, зокрема, серцево-судинної системи [1–4]. Встановлено, що помірні фізичні навантаження впливають на систему антиоксидантного захисту через підвищення ферментної активності каталази та Mn-залежної супероксиддисмутази (MnСОД), а також супроводжуються зростанням експресії мРНК MnСОД і білків-шаперонів Hsp70, які беруть участь у ренатурації білків, ушкоджених внаслідок стресу і можуть бути одним із складників важливого механізму антистресорного захисту [5, 6]. Останнім часом з'являються окремі повідомлення, отримані в експериментах на ізольованому серці, щодо ролі мітохондріальної пори (МП) у механізмі позитивного впливу на організм короткотривалих фізичних навантажень [7]. Нині відсутні дані відносно чутливості МП до індукторів її відкриття у серці при старінні за дії саме тривалих фізичних навантажень.

Серед ендогенних регуляторів МП особливої уваги заслуговує оксид азоту (NO) [8], який відіграє важливу роль у механізмах регуляції скоротливої активності міокарда та судин. В організмі NO синтезується з амінокислоти L-аргініну за участі трьох основних ізоформ NO-синтаз (NOS): конститутивних – нейрональної (nNOS) та ендотеліальної (eNOS), а також індукційної (iNOS). Крім того, в мітохондріях кардіоміоцитів експресується мітохондріальна NOS (mitoNOS), яку за ознакою подібності амінокислотної послідовності відносять до nNOS [9, 10]. Конститутивні ізоформи (cNOS) є кальцій-залежними та синтезують NO в порівняно невеликих кількостях [11], у той час як активність iNOS не залежить від вмісту Ca^{2+} і за патологічних станів останній фермент продукує надлишок NO [11].

Наразі недостатньо дослідженими залишаються молекулярні механізми, які лежать в основі дії тривалих фізичних навантажень на функціональний стан серця, та регуляція

зміни чутливості МП при дії її модуляторів – внутрішньоклітинного Ca^{2+} та ендогенного NO.

Метою нашої роботи було дослідити функцію серця та участь NO у регуляції чутливості МП до Ca^{2+} при дії тривалих фізичних навантажень у дорослих і старих щурів.

МЕТОДИКА

В експериментах використовували дорослих віком 6–7 міс і масою 180 г та старих щурів-самців лінії Вістар віком 22–24 міс і масою 350–500 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Дослідження проведені з урахуванням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986).

Тварин було поділено на 4 групи: 1-ша – контрольні дорослі; 2-га – дорослі треновані; 3-тя – контрольні старі; 4-та – старі треновані. Фізичні тренування дорослих і старих щурів здійснювали 5 днів на тиждень примусовим плаванням тварин у ванні з водою (32–34 °С) впродовж шести та чотирьох тижнів відповідно: дорослі – починаючи з 2 хв на початку та 75 хв – в кінці, старі – починаючи з 2 хв на початку та 30 хв в кінці. Скоротливу функцію серця досліджували на ізольованих за методом Лангендофа серцях, як описано раніше [12]. Видалені серця промивали охолодженим 0,9 %-м розчином KCl. Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування в нашій модифікації [13]. Дослідження відкриття МП проводили за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, ізольованих із серця щурів. Для цього їх поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс-HCl – 25, KH_2PO_4 – 3; pH 7,4 (кінцевий об'єм – 3 мл) і реєстрували зниження оптичної густини при $\lambda=520$ нм за 3 хв до і через 15 хв після набухання за наявності індуктора кальцію в інкубаційному середови-

щі. Концентрація білка становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію нативних мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора досліджували протягом 15 хв. В ізольованих мітохондріях серця визначали активність cNOS та iNOS за допомогою кількості новоутвореного цитруліну, як описано раніше [14]. Експресію генів NOS визначила за допомогою методу полімеразаної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. РНК виділяли з міокарда щурів після тривалих фізичних навантажень із використанням набору «Trizol RNA-prep» (Isogen, Росія). Зворотну транскрипцію проводили, застосовуючи набір реагентів «First Stand cDNA Synthesis Kit» («Fermentas», Литва), 1,2–1,5 мкг загальної РНК і гексамерного праймера. Отриману внаслідок зворотної транскрипції комплементарну ДНК (кДНК) піддавали генспецифічній ПЛР-ампліфікації. Для кількісної оцінки експресії генів nNOS, iNOS та eNOS використовували ПЛР у реальному часі із застосуванням «TaqMan Gene Expression Assay» (Applied Biosystems, rn 00583793-m1, rn 00561646-m1 та rn 0213263-s1). TaqMan-проби для відповідних генів було розроблено на основі послідовностей мРНК щура компанією «Applied Biosystems» (США). Експресія генів була нормалізована відносно гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH) як ендогенного контролю, використовуючи реактив «TaqMan Rodent GAPDH Control» (VICTMProbe). ПЛР-ампліфікація для генів складалася з 45 циклів: початкова денатурація при 95°C впродовж 20 с, з наступною обробкою при 95°C протягом 3 с, приєднання праймерів та елонгація – 60 °C, 30 с. Аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програми 7500 Fast Real-time PCR Software.

Отримані результати оброблені з використанням програми Origin 6.0 (Microcall Inc, США). Статистичну їх обробку проводили методом різниць за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Раніше нами було показано позитивний вплив фізичних навантажень на функціональний стан серця, а саме його скоротливу функцію, у дорослих щурів [12]. Використання моделі помірних фізичних навантажень у дослідах на ізольованому серці старих щурів, подібно до дорослих, також сприяло підвищенню ефективності роботи серця та його коронарного потоку (КП) під час реперфузії після 30-хвилинної ішемії. У таких тварин через 5 хв реперфузії тиск, що розвивав лівий шлуночок (ТЛШ), становив $35 \pm 4,6$ мм рт.ст., в той час як у старих нетренованих тварин – 24 ± 3 мм рт.ст. ($P < 0,05$). На 40-й хвилині реперфузії цей показник відновлювався до $54 \pm 3,6$ мм рт.ст. і лише до 40 ± 5 мм рт.ст. у контрольних старих тварин відносно вихідного рівня ($P < 0,05$; рис. 1,а). Для старих тренуваних тварин кінцевий діастолічний тиск (КДТ) на 5-й хвилині реперфузії після ішемії серця становив $25 \pm 1,3$ мм рт.ст., а для нетренованих тварин – 34 ± 5 мм рт.ст. Після 40-ї хвилини реперфузії спостерігали тенденцію зниження його у тренуваних тварин до $11 \pm 3,2$ мм рт.ст., а у нетренованих тварин – до 21 ± 2 мм рт.ст. (див. рис. 1,б).

Швидкість КП у тренуваних старих тварин до ішемії становила $13 \pm 0,91$ мл/хв, а у контрольних старих – $10 \pm 1,2$ мл/хв (див. рис. 1,в). Протягом усіх часових проміжків реперфузії значення у тренуваних тварин перевищувало таке у нетренованих. Киснева вартість роботи серця до ішемії у старих тренуваних була меншою на 12,5 % порівняно з нетренованими тваринами ($87,5 \pm 15$ і 100 ± 13 % відповідно). У старих нетренованих та тренуваних тварин на 40-й хвилині реперфузії серця різниця між значеннями цього показника становила 29 % (158 ± 17 і 129 ± 10 % відповідно).

Отримані результати вказують на позитивний вплив фізичних навантажень на функціональний стан серця старих тварин через покращення його скоротливої функції

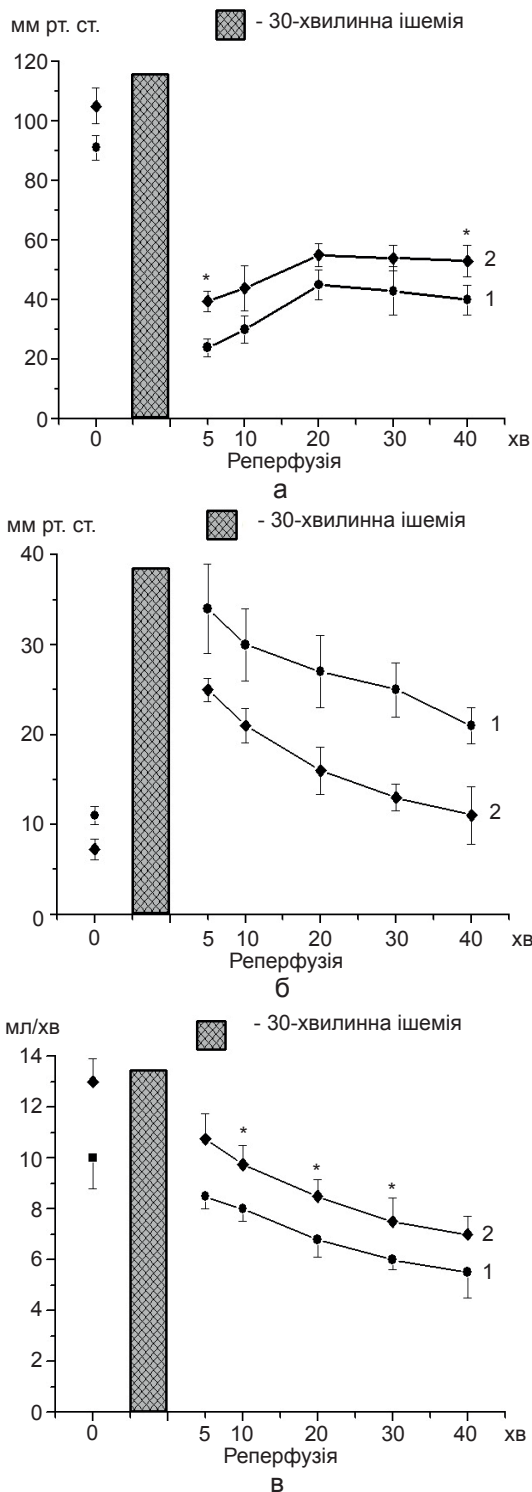


Рис. 1. Зміни тиску, що розвивався лівим шлуночком (а), кінцевого діастолічного тиску серця (б) та коронарного потоку (в) контрольних (1; n=7) та тренуваних (2; n=4) старих щурів при реперфузії ішемізованого серця * P<0,05 різниця достовірна порівняно з контролем

та збільшення стійкості серця до ішемічно-реперфузійних ушкоджень.

Реакція на ішемію-реперфузію значною мірою зумовлена відкриттям МП. Тому для пояснення отриманих позитивних ефектів від помірних фізичних навантажень на скоротливу функцію серця, доцільно було дослідити проникність мітохондріальних мембран, що пов'язана саме з формуванням і відкриттям МП, у тренуваних тварин різних вікових груп. У попередніх наших дослідженнях було показано зменшення чутливості МП до дії індуктора Ca^{2+} в серці тренуваних дорослих щурів у порівнянні з контрольними [12].

Наразі ми показали, що величина набухання мітохондрій серця старих тренуваних щурів мала тенденцію до зменшення у порівнянні зі значеннями старих щурів (рис. 2 а, криві 2, 3). За умов дії природного індуктора МП іонів кальцію у концентрації 10^{-4} моль/л спостерігали також зменшення на 26 % величини набухання мітохондрій серця старих тренуваних тварин порівняно з нетренованими (рис. 2 а, криві 4 і 5).

У дослідях *in vitro* спостерігали зниження чутливості МП до індуктора Ca^{2+} в діапазоні концентрацій 10^{-7} – 10^{-4} у серці старих щурів після їх адаптації до фізичних навантажень внаслідок збільшення на 1,5–2 порядки порогової концентрації іона, яка індукувала набухання органел, порівняно з нетренованими (див. рис. 2,б). Таким чином, результати досліджень свідчать про протекторний вплив помірних фізичних навантажень у модуляції змін проникності мітохондріальних мембран, що може бути важливим регуляторним фактором у розвитку серцево-судинних захворювань при старінні.

Відомо, що NO та його метаболіти є важливими кардіпротекторними та вазодилататорними сполуками, необхідними для функціонування як серця, так і судин. Їх протекторна роль особливо набуває значення за патофізіологічних умов. Вважається, що основним шляхом синтезу NO в серцево-судинній системі є конститутивний за дії Ca^{2+} -

залежної eNOS, у той час як за умов патології — індукбельний синтез NO Ca^{2+} -незалежною iNOS. Відкриття МП, як показано за останні роки, пов'язано з активністю цих NOS і вмістом оксиду азоту. В мітохондріях серця дорослих тренуваних щурів було показано достовірне підвищення майже вдвічі активності cNOS відносно контролю ($6,02 \pm 0,08$ і $3,64 \pm 0,27$ пмоль/хв · мг білка відповідно; $P \leq 0,05$). Тоді як у старих тренуваних щурів підвищення було незначне відносно нетренованих ($2,05 \pm 0,691$ і $1,84 \pm 0,26$ пмоль/хв · мг білка відповідно).

Разом з цим після тривалих фізичних навантажень достовірно незначно підвищу-

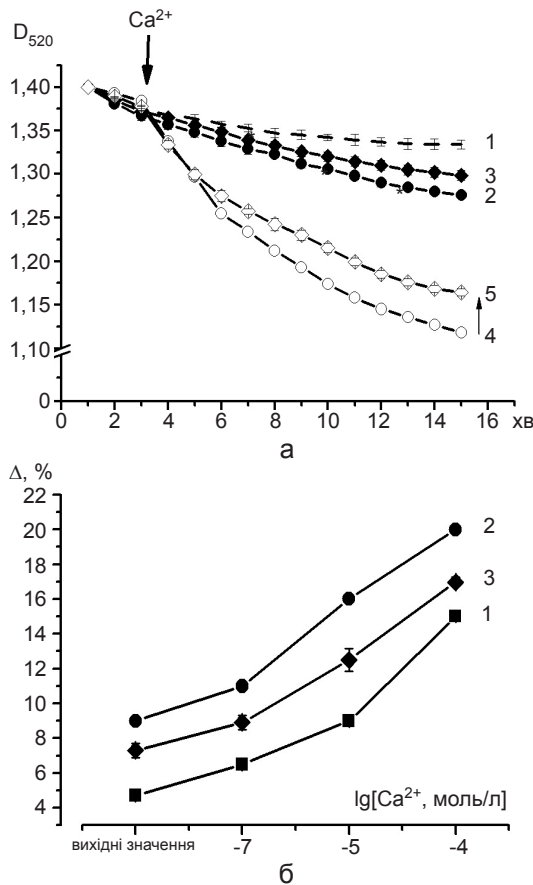


Рис. 2. Ефекти тривалих фізичних навантажень на кальційіндуковану мітохондріальну пору: а — набухання мітохондрій серця за умов дії індуктора Ca^{2+} ($n=6$): 1 — дорослі; 2 — старі; 3 — старі тренувані щури; 4 — старі щури і дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л); 5 — старі тренувані щури і дія Ca^{2+} ; б — зміни чутливості мітохондріальної пори до кальцію (10^{-7} – 10^{-4} моль/л): 1 — дорослі; 2 — старі; 3 — старі тренувані щури

валась активність iNOS у дорослих щурів щодо контролю ($3,07 \pm 0,21$ і $1,73 \pm 0,24$ пмоль/хв · мг білка відповідно; $P \leq 0,05$). У старих тренуваних щурів спостерігали зниження цього показника у порівнянні з нетренованими ($12,29 \pm 3,11$ і $9,25 \pm 1,24$ пмоль/хв · мг білка відповідно; $P \leq 0,05$).

Отже, у дорослих щурів за умов дії помірних фізичних навантажень оксид азоту, синтезований мітохондріальною cNOS, виступає ендogenousним інгібітором відкриття МП. Отримані результати дають можливість припустити, що помірна активація iNOS спричиняє певний регуляторний вплив відносно чутливості кальційіндукованого відкриття МП за умов фізичних навантажень дорослих щурів. Тоді як у старих щурів регуляція пороутворення здійснювалася за рахунок суттєвого зниження активності iNOS на тлі незначного зростання активності cNOS. Таким чином, наші результати вказують на ймовірну участь NO в ендogenousних механізмах попередження пороутворення за умов тривалих фізичних навантажень у мітохондріях серця дорослих і старих щурів.

Роль модуляції синтезу оксиду азоту у зменшенні чутливості МП до Ca^{2+} в серці дорослих і старих тренуваних щурів досліджували за допомогою зменшення продукції NO в мітохондріях одноразовим введенням тваринам блокатора активності NOS L-NAME (10 мг/кг). Показано збільшення кальційіндукованого набухання мітохондрій серця як дорослих (рис. 3, графіки 1, 2), так і старих тренуваних щурів за умов введення блокатора (рис. 3, графіки 3, 4) також збільшувалася порівняно з тренуваними тваринами, яким його не вводили. Також встановлено, що введення тваринам L-NAME збільшувало чутливість МП до дії індуктора Ca^{2+} (10^{-7} – 10^{-4} моль/л) як дорослих, так і старих тренуваних щурів (рис. 4, а, б).

Отже, після дії тривалих фізичних навантажень на дорослих і старих щурів спостерігали зменшення чутливості МП до Ca^{2+} ,

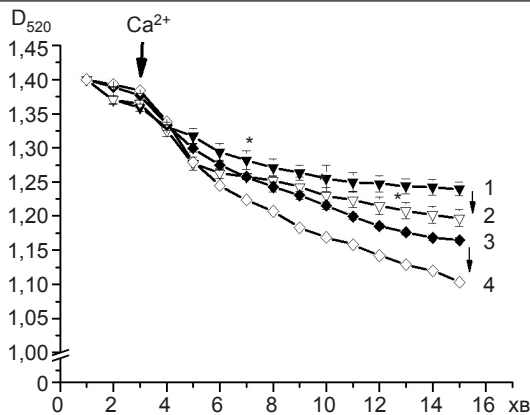


Рис. 3. Набухання мітохондрій серця дорослих (n=4) і старих (n=3) тренуваних щурів за умов інгібування NO-синтази (L-NAME) за наявності індуктора Ca^{2+} (10^{-4} моль/л) 1 –дорослі треновані щури, 2 –дорослі треновані щури за умов введення L-NAME, 3 – старі треновані щури, 4 – старі щури за умов введення L-NAME

ймовірно, за рахунок збільшення вироблення NO мітоNOS.

За допомогою ПЛР у реальному часі доведено, що за умов фізичних навантажень відбуваються суттєві зміни в експресії мРНК генів nNOS, iNOS та eNOS у серці (рис. 5) тварин різного віку. Слід відмітити, що рівень експресії мРНК eNOS значно перевищував такий nNOS та iNOS.

Показано, що в серці старих щурів рівень експресії мРНК nNOS підвищений в 1,7 раза,

мРНК iNOS – в 24 рази ($P<0,05$), тоді як eNOS знижений у 2,4 раза порівняно з дорослими тваринами. У останніх за умов фізичного навантаження рівень експресії мРНК nNOS підвищується у 5 разів, та мРНК iNOS– в 24 рази ($P<0,05$), а eNOS знижується у 3,5 раза порівняно з дорослими нетренованими щурами. В серці старих тренуваних щурів рівень експресії мРНК nNOS знижувався в 4 рази ($P<0,05$) та iNOS удвічі порівняно зі старими нетренованими тваринами. За цих умов спостерігали підвищення у 3 рази рівня експресії мРНК eNOS відносно контрольної групи старих щурів. Порівнюючи рівень експресії цього гена з таким контрольних дорослих тварин, ми спостерігаємо відновлення рівня експресії мРНК eNOS до базального, що є позитивним ефектом. Отже, встановлено, що за умов фізичних навантажень в тканині серця відбувається перерозподіл експресії NO-синтезувальних ферментів.

Таким чином, тривалі фізичні навантаження сприяють поліпшенню функціонального стану серця при старінні, а саме, його скоротливої функції, а також підвищенню резистентності органу до оксидативного стресу за умов реперфузійних ушкоджень, що зумовлено зниженням чутливості МП до дії іонів кальцію в серці на тлі підвищення активності

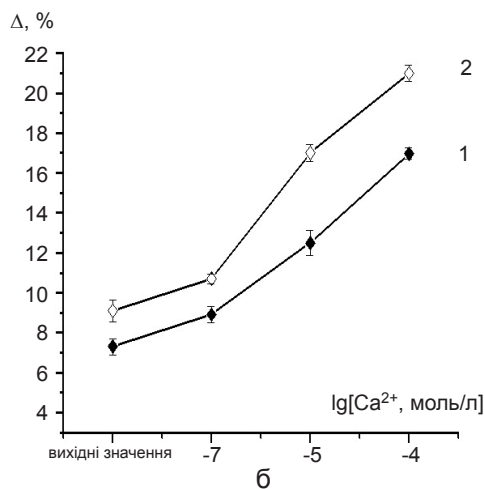
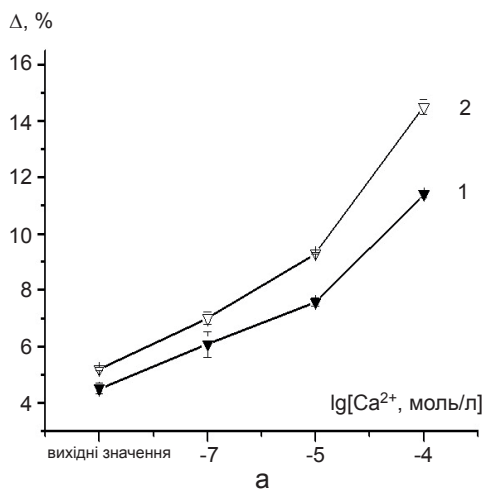


Рис. 4. Концентраційна залежність різниці величини набухання за наявності іонів кальцію мітохондрій серця дорослих (а; n=4) та старих (б; n=3) тренуваних щурів за умов відсутності (1) та наявності (2) інгібування NOS (L-NAME)

мітохондріальної сNOS та відновлення рівня експресії мРНК eNOS, що забезпечує синтез

оксиду азоту, який може відігравати роль ендogenous інгібітора пороутворення.

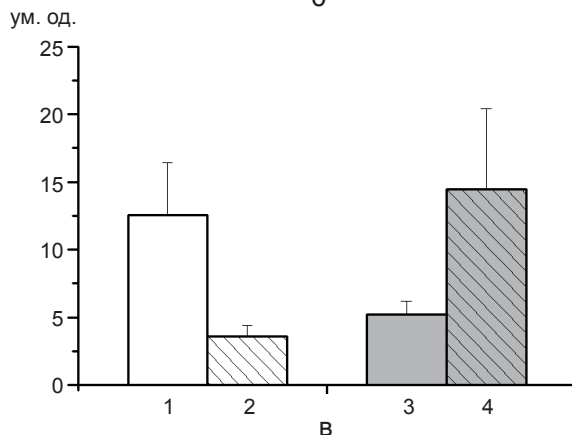
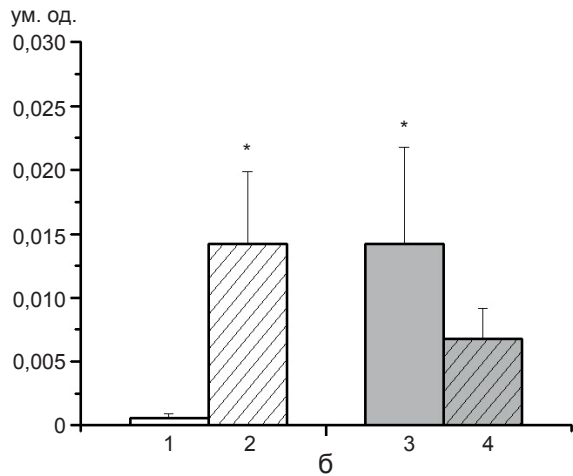
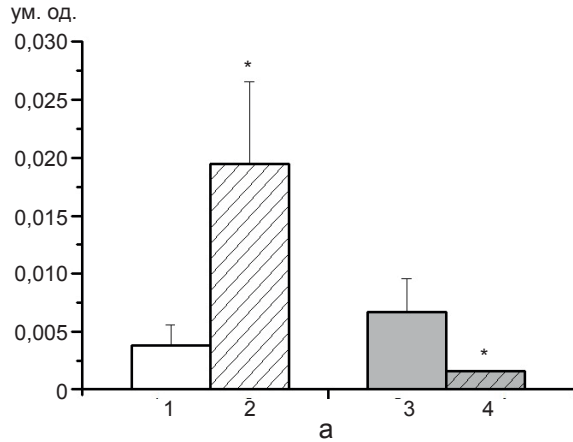


Рис. 5. Експресія мРНК NO-синтази (NOS) в серці дорослих та старих щурів за умов тривалих фізичних навантажень: а – нейрональної, б – індукційної, в – ендотеліальної. 1 – дорослі щури; 2 – дорослі треновані щури; 3 – старі щури; 4 – старі треновані щури; * – різниця достовірна порівняно з дорослими ($P < 0,05$)

С.В. Черная, Н.А. Струтинская, Е.Н. Семенихина, С.А. Таланов, В.Е. Досенко, А.В. Коцюруба, Г.Л. Вавилова, В.Ф. Сагач

ДЛИТЕЛЬНЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ НАГРУЗКИ УЛУЧШАЮТ СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ СЕРДЦА У СТАРЫХ КРЫС ПУТЕМ NO-ЗАВИСИМОГО УМЕНЬШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ К КАЛЬЦИЮ

Исследовали влияние длительных физических нагрузок на показатели функционального состояния изолированного по Лангендорфу сердца старых крыс в условиях ишемии-реперфузии, чувствительность кальцийиндуцированной митохондриальной поры (МП), а также роль NO-зависимых механизмов регуляции порообразования. Так, реперфузионные нарушения сократительной функции миокарда и его кислородного обмена были менее выражены у старых крыс, адаптированных к физическим нагрузкам, что свидетельствует об их положительном влиянии. Показано уменьшение чувствительности МП к действию Ca^{2+} в сердце старых тренированных крыс вследствие увеличения на 1,5–2 порядка пороговой концентрации иона, которая индуцировала набухание органелл по сравнению с нетренированными животными. Вместе с этим в митохондриях сердца тренированных взрослых крыс наблюдали повышение почти вдвое активности конститутивной NO-синтазы (сNOS) относительно контроля ($6,02 \pm 0,08$ и $3,64 \pm 0,27$ пмоль / мин · мг белка соответственно; $P \leq 0,05$) и незначительный рост активности индуцибельной NOS (iNOS). В старых тренированных животных регуляция порообразования осуществлялась за счет достоверного снижения активности iNOS относительно контроля старых крыс ($12,29 \pm 3,11$ и $9,25 \pm 1,24$ пмоль / мин · мг белка соответственно; $P \leq 0,05$) на фоне незначительного роста активности сNOS. В условиях снижения продукции NO в митохондриях путем однократного введения тренированным животным разного возраста блокатора активности NO-синтазы L-NAME (10 мг/кг) было показано повышение чувствительности МП к действию Ca^{2+} в сердце, что указывает на роль оксида азота как ингибитора порообразования при тренировках. С помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени установлено, что уровень экспрессии мРНК гена eNOS в сердце существенно превышает таковой nNOS и iNOS. При этом, в сердце взрослых тренированных крыс уровень экспрессии мРНК nNOS повышался в 5 раз, мРНК iNOS - в 24 раза ($P < 0,05$), а уровень экспрессии eNOS снижался в 3,5 раза по сравнению с нетренированными. В сердце старых тренированных крыс уровень экспрессии мРНК nNOS снижался в 4 раза ($P < 0,05$) и iNOS – 2 раза по сравнению

со старыми нетренированными животными. В условиях тренировки наблюдали восстановление уровня экспрессии мРНК eNOS к такому контрольных взрослых животных. Таким образом, длительные физические нагрузки способствовали улучшению функционального состояния сердца при старении, а именно, его сократительной функции, а также повышению резистентности органа к оксидативного стресса в условиях реперфузионных повреждений, что обусловлено снижением чувствительности МП к действию ионов кальция в сердце на фоне повышения активности митохондриальной cNOS и восстановления уровня экспрессии мРНК eNOS, которые обеспечивают синтез оксида азота – эндогенного ингибитора порообразования.

Ключевые слова: тренировки физическими нагрузками, сердце, ишемия-реперфузия, митохондриальная пора, оксид азота, экспрессия гена, старые крысы.

S.V. Chorna, N.A. Strutynska, O.M. Semenykhina, S.O.Talanov, Dosenko V.E., A.V.Kotsuruba, G.L. Vavilova, V.F. Sagach

LONG EXERCISE TRAINING IMPROVES HEART FUNCTION IN AGED RATS BY NO-DEPENDENT DECREASE IN MITOCHONDRIAL PORE SENSITIVITY TO CALCIUM

The effect of long exercise training on the indexes of the functional state isolated by Lanhendorf heart of old rats during ischemia-reperfusion, the sensitivity of calcium-induced mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening and the role of NO-dependent mechanisms of pore-formation regulatory were investigated. Thus, reperfusion injury of the heart contractile function and its myocardial oxygen metabolism were less pronounced in old rats adapted to exercise long training pointing for its positive effect. It is shown a decreased sensitivity of MPTP to its inductor Ca^{2+} in the heart of old trained rats due to an increase by 1.5-2 orders in threshold Ca^{2+} concentration, which induces swelling of organelles. At the same time, in heart mitochondria of trained adult rats we observed almost doubled activity of constitutive NO-synthase (cNOS) compared with control ($6,02 \pm 0,08$ and $3,64 \pm 0,27$ pmol / min * mg protein, respectively ($P \leq 0,05$)) and a slight increase in the activity of inducible NO-synthase (iNOS). Regulation of pore formation in older animals trained was performed by a significant decreased iNOS activity compared with control aged rats ($12,29 \pm 3,11$ and $9,25 \pm 1,24$ pmol/min*mg protein, respectively ($P \leq 0,05$)) on the background slight increased in cNOS activity. We hypothesized that a decrease in sensitivity of the MPTP-opening occurred due to an increased production of NO pointing to its role as an inhibitor of pore formation during exercise. It has been shown to increase the sensitivity of MPTP to Ca^{2+} in the heart under the conditions of reduce the NO production by a single injection of NO synthase inhibitor N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in dose of 10 mg/kg to

trained animals of all ages. Using *real-time polymerase chain reaction* we showed that the gene expression of eNOS in the heart was significantly greater than that of nNOS and iNOS. Thus, in the heart of adult trained rats the expression of mRNA nNOS were increased 5 times, mRNA iNOS - 24 times ($P < 0,05$), and the gene expression of eNOS decreased 3.5 times compared with untrained rats. In the heart of old trained rats the expression of nNOS mRNA decreased 4 times ($P < 0,05$) and iNOS mRNA - 2 times compared with the old untrained animals. In heart of old trained rats we observed a workout recovery of eNOS mRNA expression to the values of control adult animals. Taken together, our data suggest that a long-term exercise training improves functional state of the heart during aging and increases the resistance of body to oxidative stress under reperfusion injury due to a decreased sensitivity of MPTP to Ca^{2+} and increased activity of mitochondrial cNOS. Key words: exercise training, heart, ischemia-reperfusion, mitochondrial permeability transition pore, nitric oxide, gene expression, aging rats.

Bogomoletz Institute of physiology NAS of Ukraine, Kyiv

REFERENCES

1. Hull SS, Vanoli E, Adamson PB, Verrier RL, Foreman RD, Schwartz PJ. Exercise training confers anticipatory protection from sudden death during acute myocardial ischemia. *Circulation*. 1994; 89: 548-552.
2. Powers, SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely AR, Jessup J. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol*. 1998; 275: 1468-1477.
3. Campos JC, Gomes K MS, Ferreira JCB. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. *Food and Chem Toxicol*. 2013; 62: 107-119.
4. Williams MA, Fleg JL, Ades PA, Chaitman BR, Miller NH, Mohiuddin SM, Ockene IS, Taylor CB, Wenger NK. Secondary prevention of coronary heart disease in the elderly (with emphasis on patients ≥ 75 years of age): An American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology Subcommittee on Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention. *Circulation*. 2002; 105(14): 1735-1743.
5. Lennon SL, Quindry JC, French JP, Kim S, Mehta JL, Powers SK. Exercise and myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion. *Acta Physiol Scand*. 2004; 182: 161-169.
6. Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely R A, Hamilton K, Coombes J, Naito H. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol*. 2001; 91: 2205-2212.
7. Ciminelli M, Ascah A, Bourduas K, Burelle Y. Short term training attenuates opening of the mitochondrial permeability transition pore without affecting myocardial function following ischemia-reperfusion. *Mol Cell Biochem*. 2006; 291: 39-47.
8. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol and Cell Cardiol*. 2014.

9. Brookes PS. Mitochondrial nitric oxide synthase. Mitochondrion. 2004; 3: 187-204.
10. Lacza Z, Pankotai E, Busija DW. Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. Front Biosci. 2009; 14: 4436-4443.
11. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. J Pathol. 2000; 90: 244-254
12. Chorna SV, Talanov SO, Strutynska NA, Vavilova G.L., Kotsuruba A.V., Gaidai N.M., Sagach V.F. The functional state the rat heart during ischemia-reperfusion, the sensitivity of calcium-induced mitochondrial permeability transition pore opening and the uncoupling protein 3 expression following long exercise training. Fiziol Zh. 2010; 56 (2): 13-21.
13. Sagach VF, Vavilova GL, Rudyk OV, Strutynska NA. Release of unidentified substances of mitochondrial origin--evidence of mitochondrial permeability transition pore opening in the heart mitochondria of rats. Fiziol Zh. 2003; 49 (5): 3-12.
14. Sagach VF, Rudyk OV, Vavilova GL, Kotsiuruba AV, Tkachenko JuP. Melatonin recovers ischemic tolerance and decreases the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening in the heart of aging rats. Fiziol Zh. 2006; 52 (3): 3-14.

Матеріал надійшов до редакції 30.09.2014