

7. Peart J.N., Gross E.R., Reichelt M.E. et al. // Basic Res. Cardiol. – 2008. – Vol. 103, No. 5. – P. 454–463.
8. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J.J. // Mol. Cell. Cardiol. – 1997. – Vol. 29, No. 8. – P. 2187–2195.
9. Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E. et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2003. – Vol. 285, No. 2. – P. H579–H588.

Поступила 16.02.2016

Сведения об авторе

Мухомедзянов Александр Валерьевич, лаборант лаборатории экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии.

Адрес: 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а.

E-mail: sasha_m91@mail.ru.

УДК 612.176.2

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДА К ИШЕМИЧЕСКОМУ-РЕПЕРФУЗИОННОМУ ПОВРЕЖДЕНИЮ СЕРДЦА У КРЫС, АДАПТИРОВАННЫХ К ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Е.С. Прокудина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт кардиологии", Томск
E-mail: goddess27@mail.ru

RESISTANCE OF MYOCARDIAL MITOCHONDRIA IN ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY OF THE HEART IN RATS ADAPTED TO CHRONIC HYPOXIA

E.S. Prokudina

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Cardiology", Tomsk

Исследованы параметры дыхания, величина трансмембранного потенциала и Ca_2^{+} -связывающая способность митохондрий, выделенных из миокарда перфузируемых по методу Лангендорфа сердец крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Моделирование ишемии и реперфузии как у интактных, так и у адаптированных животных приводило к снижению Ca_2^{+} -связывающей способности митохондрий, что указывает на увеличение чувствительности МРТ-пор (mitochondrial permeability transition pore) к ионам кальция. В то же время зафиксировано: снижение трансмембранного потенциала, уменьшение коэффициента АДФ/О (соотношение количественных величин добавленного АДФ и поглощенного в течение состояния 3 кислорода) и замедление дыхания митохондрий в состоянии 3. Вместе с тем наблюдалось, что адаптация животных к хронической гипоксии способствует повышению устойчивости митохондрий миокарда к негативному влиянию ишемии и реперфузии.

Ключевые слова: сердце, ишемия, митохондрии, адаптация к гипоксии.

The parameters of respiration, the value of the transmembrane potential, and Ca_2^{+} -binding capacity of the mitochondria isolated from the Langendorff-perfused hearts of rats adapted to chronic continuous normobaric hypoxia were analyzed. Modeling of ischemia and reperfusion in intact and adapted animals resulted in reduced Ca_2^{+} -binding capacity of mitochondria, indicating an increase in the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore (MPT-pore) to calcium ions. At the same time, reduction in transmembrane potential, reduction in ADP/O ratio (the ratio of added ADP to oxygen consumption in State 3), and inhibition of mitochondrial state 3 respiration were observed. Along with that, the study demonstrated that the adaptation of animals to chronic hypoxia promotes the resistance of myocardial mitochondria to the negative effects of ischemia and reperfusion.

Key words: heart, ischemia, mitochondria, adaptation to hypoxia.

Введение

Внутригоспитальная летальность от острого инфаркта миокарда (ОИМ) в НИИ кардиологии составляет 13,8% [3], а в европейских странах достигает 7% [10]. Такой высокий показатель летальности во многом объясняется отсутствием патогенетически обоснованных методов повышения толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии. Определенные перспективы в этом направлении может иметь адаптация организма к гипоксии,

стрессу, холоду и другим экстремальным воздействиям [13]. Однако механизмы формирования повышенной устойчивости сердца при адаптации к хронической гипоксии остаются недостаточно изученными. Согласно общепринятому мнению, ключевым звеном гипоксической адаптации является перестройка энергетического метаболизма [2]. Вместе с тем взаимосвязь функционального состояния митохондрий с механизмами инициации клеточной гибели или, напротив, повышения резистентности кардиомиоцитов к гипоксии-реоксигенации остается

неясной. Известно, что индукция апоптоза и некроза кардиомиоцитов во многом определяется состоянием митохондриальных пор переменной проницаемости (MPT-пор, mitochondrial permeability transition pore).

Цель: оценить влияние адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии на функциональное состояние митохондрий при моделировании глобальной ишемии и реперфузии миокарда.

Задачи:

- 1) изучить влияние адаптации хронической непрерывной нормобарической гипоксии на показатели дыхания миокардиальных митохондрий после ишемии-реперфузии изолированного сердца у крыс;
- 2) оценить трансмембранный потенциал митохондрий, изолированных из миокарда крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии;
- 3) исследовать устойчивость MPT-пор митохондрий к ионам кальция после ишемии-реперфузии изолированного сердца у крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на крысах-самцах Вистар массой 250–300 г. В контрольной группе изолированные сердца животных подвергали нормотермической перфузии на протяжении 95 мин без моделирования ишемии. Сердца крыс 2-й группы подвергали воздействию глобальной ишемии (45 мин)-реперфузии (30 мин). Животных 3-й группы перед изоляцией сердца и моделированием ишемии-реперфузии адаптировали к хронической непрерывной нормобарической гипоксии при 12% O₂, 0,03% CO₂ и нормальном атмосферном давлении на протяжении 21 суток [11]. Давление O₂ и CO₂ внутри гипоксической камеры постоянно поддерживали системой “Био-нова-204G4R1” (НТО “Био-нова”). У крыс, наркотизированных диэтиловым эфиром, извлекали сердца и помещали в охлажденный до 4 °C раствор Кребса–Хензеляйта. Аорту канюлировали и осуществляли ретроградную перфузию по методу Лангендорфа буфером Кребса–Хензеляйта. Ишемию моделировали с помощью полного прекращения подачи буферного раствора на 45 мин с последующей 30-минутной реперфузией.

Митохондрии выделяли из миокарда желудочков методом дифференциального центрифугирования [4, 6]. Для этого желудочки сердца измельчали ножницами при 2 °C, а затем гомогенизировали (стекло-стекло) в растворе, содержащем (в mM): 70 сахара, 210 маннитол, 1 EGTA, 10 Hepes, 5 мг/мл БСА, pH 7,4. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 900 g в рефрижераторной центрифуге “Eppendorf 5810 R” (“Eppendorf AG”). Супернатант отбавляли, а митохондрии, содержащиеся в нем, осаждали центрифугированием при 9000 g в течение 10 мин. Осадок, содержащий митохондрии, промывали буфером (70 mM сахара, 210 mM маннитол, 0,1 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH 7,4) и осаждали повторным 10-минутным центрифугированием при 9000 g. Содержание белка в суспензии митохондрий определяли по методу Брэдфорд [5].

Измерение трансмембранного потенциала митохондрий (Дш) проводили с использованием катионного флюо-

оресцентного зонда – этилового эфира тетраметилродамина (TMRE, tetramethylrhodamine ethyl ester) – на спектрофлюориметре “Shimadzu RF-5301-PC” при длинах волн возбуждения/излучения 550 и 575 нм [12] в буфере, содержащем 200 mM сахара, 10 mM трис-HCl, 1 mM KH₂PO₄, 10 мкМ EGTA, 0,3 mM пирувата, 0,3 mM малата, pH 7,4 при 25 °C. Конечная концентрация TMRE составляла 150 нмоль/л, содержание митохондрий – 1 мг/мл [14]. “Сброс” Дш осуществляли добавлением разобщителя FCCP – Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone – в конечной концентрации 0,1 мкМ. За величину трансмембранного потенциала принимали падение флюоресценции при добавлении FCCP.

Состояние MPT-поры оценивали по Ca₂⁺-связывающей способности митохондрий, которую определяли с помощью флюоресцентного Ca₂⁺-чувствительного зонда Calcium Green-5N (“Invitrogen, Molecular Probes Inc.”) при длинах волн возбуждения/излучения 506 и 532 нм [4, 8, 14] на спектрофлюориметре “Shimadzu RF-5301-PC”. Среда инкубации содержала (в mM): 200 сахара, 10 трис-HCl, 1 mM KH₂PO₄, 0,01 M EGTA, 0,3 пирувата, 0,3 малата, pH 7,4 (25 °C, объем 3 мл), при концентрации Calcium Green-5N 100 nM и митохондрий 1 мг/мл. К суспензии митохондрий дробно добавляли по 100 nM CaCl₂. Ca₂⁺-связывающую способность митохондрий вычисляли по максимальному количеству аккумулированного митохондриями Ca₂⁺ в пересчете на 1 мг митохондриального белка [8].

Оценку параметров дыхания митохондрий проводили по уровню поглощения ими кислорода. Среда инкубации митохондрий имела следующий состав: 180 mM сахара, 70 mM маннитол, 5 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, pH 7,37 [14]. Скорость поглощения кислорода измеряли в присутствии НАДН-зависимых субстратов – 3 mM малата и 3 mM пирувата (состояние 2, V₂) – и после добавления 200 nM АДФ (состояние 3, V₃), а также в момент завершения синтеза АДФ (состояние 4, V₄). Эффективность дыхания вычисляли по соотношению количественных величин добавленного АДФ и поглощенного в течение состояния 3 кислорода (коэффициент АДФ/О).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 6.0. Рассчитывали среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (SEM). Достоверность различий между группами оценивали с помощью критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

В группе неадаптированных крыс, сердце которых было подвергнуто 45-минутной ишемии и 30-минутной реперфузии, наблюдалось статистически достоверное снижение абсолютной скорости НАДН-зависимого дыхания в состоянии 3 (V₃) по сравнению с показателем у интактных животных (таблица). Наряду с этим в указанной группе было зарегистрировано достоверное снижение коэффициента АДФ/О, что говорит о разобщении процессов окисления и фосфорилирования. При этом величина трансмембранного потенциала (Дш) митохондрий, выделенных после окончания ишемии-реперфузии, оказалась на 20% ниже, чем в сердцах интактных крыс

Таблица

Параметры дыхания, трансмембранный потенциал (Д ш) и Ca_2^+ -связывающая способность (КСС) митохондрий при ишемии-реперфузии и адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии ($M \pm \text{SEM}$)

Параметры дыхания	Контроль (n=16)	Ишемия-реперфузия (n=11)	Адаптация к гипоксии + ишемия-реперфузия (n=10)
V2, нМ [O ₂]/мг белка/мин (НАДН-зависимое дыхание)	32,34±2,18	28,59±5,76	25,77±4,84
V3, нМ [O ₂]/мг белка/мин (НАДН-зависимое дыхание)	121,98±12,98	93,96±13,19*	121,67±27,88 ⁺
V4, нМ [O ₂]/мг белка/мин (НАДН-зависимое дыхание)	41,06±2,86	36,18±7,89	50,66±14,77
АДФ/О, нМ АДФ/нМ атом[O] (НАДН-зависимое дыхание)	2,4±0,52	1,76±0,21*	2,10±0,19 ⁺
Д ш, U/мг белка	14,22±1,2	11,25±1,8*	13,85±1,1 ⁺
КСС, нМ [Ca ²⁺]/мг белка	283,5±21	227,0±16*	250,0±17 ⁺

Примечание: p<0,05 по отношению * – к контролю; ⁺ – к ишемии-реперфузии.

(таблица).

Нарушение продукции АТФ при ишемии и реперфузии является общеизвестным фактом. Так, после 40-минутной коронароокклюзии уровень АТФ снижается до 35% от нормы и остается на 22% ниже нормы после 40-минутной реперфузии [1]. Уменьшение количества АТФ является следствием замедления скорости его синтеза. Так, после тотальной 30-минутной ишемии и последующей реперфузии (15 мин) изолированного перфузируемого сердца крысы дыхание митохондрий в состоянии 3, косвенно характеризующее скорость синтеза АТФ, падает на 31% [7]. Объяснить снижение скорости дыхания и продукции АТФ, наблюдаемое после окончания реперфузии, нехваткой кислорода или субстратов нельзя. Вполне очевидно, что в данном случае происходит нарушение синтеза АТФ в митохондриях.

Причиной замедления синтеза АТФ в условиях реперфузии может быть потеря цитохрома С. Цитохром С является одним из звеньев дыхательной цепи, поэтому его утечка из митохондрий в цитоплазму может привести к снижению скорости транспорта электронов и уменьшению скорости дыхания митохондрий. Так, обнаружено 3-кратное уменьшение количества цитохрома С в митохондриях, выделенных из реперфузируемого сердца [7]. Главным каналом выхода цитохрома С из митохондрий является открывающаяся в условиях патологии МРТ-пора [9]. МРТ-поры митохондрий миокарда кролика, подвергнутого коронароокклюзии-реперфузии *in vivo*, оказываются более чувствительными к нагрузке ионами Ca_2^+ [4]. Это может быть причиной их преждевременного открытия, утечки цитохрома С и, соответственно, снижения скорости дыхания митохондрий.

В наших экспериментах открытие МРТ-пор митохондрий миокарда, подвергнутого ишемии-реперфузии, происходило под влиянием меньшего количества Ca_2^+ , чем в группе интактных крыс (таблица). Иными словами, Ca_2^+ -связывающая способность митохондрий кардиомиоцитов после ишемии-реперфузии оказалась на 16% (p<0,05) ниже таковой в митохондриях интактных сердец.

Таким образом, ишемия-реперфузия сердца приводит к дисфункции митохондрий, которая характеризуется уменьшением коэффициента АДФ/О, снижением скорости дыхания в состоянии 3, падением Дш и снижением устойчивости МРТ-поры к нагрузке ионами Ca_2^+ .

В ходе дальнейшего исследования мы обнаружили, что изменение дыхания митохондрий, индуцированное ише-

мией-реперфузией, практически не выявляется в миокарде крыс, предварительно адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (таблица). После ишемии-реперфузии скорость дыхания в состоянии 3 (V3) у таких животных оказалась достоверно выше, чем у неадаптированных особей (таблица). Значение коэффициента АДФ/О у таких особей было выше, чем в сердцах неадаптированных крыс, подвергнутых воздействию ишемии-реперфузии на миокард (таблица). Кроме того, у адаптированных крыс после воздействия ишемии-реперфузии на сердце не претерпевала изменений и величина Дш (таблица).

Сохранение величины трансмембранного потенциала является следствием функциональной и структурной сохранности внутренней мембраны митохондрий адаптированных крыс, важнейшим условием которой является отсутствие неспецифической проницаемости митохондриальных мембран, т.е. поддержание МРТ-пор в закрытом состоянии [9]. Как показали наши исследования (таблица), величина Ca_2^+ -связывающей способности митохондрий крыс, подвергнутых предварительной адаптации, не снижалась при моделировании ишемии-реперфузии и оставалась достоверно неотличимой от этого показателя в группе контроля. Сохранение высокой Ca_2^+ -связывающей способности митохондрий после реперфузии сердец адаптированных животных как раз и свидетельствует об устойчивости МРТ-поры к открытию. Наши данные согласуются с результатами китайских физиологов [15], которые в экспериментах на крысах, адаптированных к периодической гипобарической гипоксии, также обнаружили, что адаптация приводит к увеличению устойчивости кардиальных митохондрий к нагрузке ионами Ca_2^+ .

Проведенные исследования показали, что воздействие ишемии и реперфузии на сердце приводит к снижению Ca_2^+ -связывающей способности митохондрий. Этот факт указывает на увеличение чувствительности МРТ-пор к ионам Ca_2^+ . Одновременно было зафиксировано снижение скорости дыхания митохондрий в состоянии 3 на НАДН-зависимых субстратах, а также разобщение окислительного фосфорилирования и уменьшение величины Дш. Адаптация животных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии в определенной мере способствует сохранению функционального состояния митохондрий после воздействия ишемии-реперфузии на

изолированное перфузируемое сердце. Мы предполагаем, что повышение устойчивости митохондрий к воздействию гипоксии и реоксигенации на миокард может иметь прямое отношение к механизмам кардиопротективного действия адаптации.

Выводы

1. Адаптация крыс к хронической непрерывной нормобарической гипоксии повышает скорость дыхания миокардиальных митохондрий в состоянии 3, а также коэффициент АДФ/О после ишемии-реперфузии изолированного сердца у крыс.
2. Трансмембранный потенциал митохондрий миокарда крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии, не снижается после моделирования глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца.
3. Устойчивость МРТ-пор митохондрий к нагрузке ионами кальция сохраняется на высоком уровне после ишемии-реперфузии изолированного сердца у крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Литература

1. Литвицкий П.Ф., Сандриков В.А., Демуров Е.А. Адаптивные и патогенные эффекты реперфузии и реоксигенации миокарда. – М.: Медицина, 1994. – 320 с.
2. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции // Пат. физиол. и Экспер. тер. – 2011. – № 1. – С. 3–19.
3. Марков В.А., Рябов В.В., Максимов И.В. и др. Вчера, сегодня, завтра в диагностике и лечении острого инфаркта миокарда // Сибирский медицинский журнал (Томск). – 2011. – Т. 26, № 2, вып. 1. – С. 8–13.
4. Argaud L., Gateau-Roesch O., Muntean D. et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2005. – Vol. 38, No. 2. – P. 367–374.
5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
6. Chen X., Jennings D.B., Medeiros D.M. Impaired cardiac mitochondrial membrane potential and respiration in copper-deficient rats // J. Bioenerg. Biomembr. – 2002. – Vol. 34, No. 5. – P. 397–406.
7. Correa F., Garcia N., Robles C. et al. Relationship between oxidative stress and mitochondrial function in the post-conditioned heart // J. Bioenerg. Biomembr. – 2008. – Vol. 40, No. 6. – P. 599–606.
8. Gomez L., Paillard M., Thibault H. et al. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion // Circulation. – 2008. – Vol. 117, No. 21. – P. 2761–2768.
9. Halestrap A.P. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection // Biochem. Soc. Trans. – 2010. – Vol. 38, No. 4. – P. 841–860.
10. Mandelzweig L., Battler A., Boyko V. et al. The second Euro Heart Survey on acute coronary syndromes: Characteristics, treatment, and outcome of patients with ACS in Europe and the Mediterranean Basin in 2004 // Eur. Heart J. – 2006. – Vol. 27, No. 19. – P. 2285–2293.
11. Neckar J., Szarszoi O., Herget J. et al. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia // Physiol. Res. – 2003. – Vol. 52, No. 2. – P. 171–175.
12. Scaduto R.C., Grotjohann L.W. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives // Biophys. J. – 1999. – Vol. 76, No. 1, Pt. 1. – P. 469–477.
13. Selye H. The Story of the Adaptation Syndrome. – Montreal, 1952. – 225 p.
14. Singh I.N., Sullivan P.G., Deng Y. et al. Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2006. – Vol. 26, No. 11. – P. 1407–1418.
15. Zhu W.Z., Xie Y., Chen L. et al. Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2006. – Vol. 40, No. 1. – P. 96–106.

Поступила 17.02.2016

Сведения об авторе

Прокудина Екатерина Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии.
Адрес: 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а.
E-mail: goddess27@mail.ru.