

В.Ф. Сагач, Т.В. Шиманська, С.М. Надточій

Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори

В експериментах на ізолюваному серці морських свинок на моделі ішемії – реперфузії показано, що наряду з коронарострикцією, аритмією, угнетением сократительной активности и увеличением кислородной стоимости работы миокарда в оттекающем от реперфузируемого сердца растворе с помощью спектрофотометрического метода на длине волны 250 нм регистрируется появление стабильного вещества. Подобные нарушения функции сердца и появление в перфузате указанного фактора отмечены также при воздействии фениларсиноксида и антимицина А, известных активаторов митохондриальной поры. Ишемия – реперфузия и воздействие указанных агентов приводили также к выходу фактора в оттекающую кровь наркотизированных животных. В то же время использование классического ингибитора митохондриальной поры циклоспорина А или водорастворимого витамина Е – тролкса существенно уменьшало нарушения кардиодинамики и выход фактора в перфузат при реперфузии сердца. Митохондриальное происхождение фактора было подтверждено с помощью активаторов и ингибиторов митохондриальной поры в экспериментах на изолированных митохондриях. Таким образом, зарегистрированный нами фактор высвобождается из митохондрий при открытии митохондриальной поры и может быть использован как маркер ее открытия в экспериментах in vitro и in vivo.

ВСТУП

Протягом останніх років [7,14,21] проводяться дослідження структури та функції так званих мітохондріальних пор (МП) та їх ролі у розвитку патології. Ще у 1976 р. Хантер вперше показав, що при збільшенні концентрації Ca^{2+} в суспензії ізолюваних мітохондрій в їх мембрані можуть утворюватися неселективні канали [16]. Довгий час структура цих каналів, умови їх активації, пригнічення і, найголовніше, їх фізіологічна роль залишалися невивченими. Більш ніж десять років знадобилося для з'ясування структури пори і ще десять для визначення її функціональної ролі.

Нині вже відомо, що МП складається з трьох білкових структур - потенціал-

залежного аніонного каналу на зовнішній мітохондріальній мембрані [6, 15], АТФ-АДФ-транслокази на внутрішній мембрані [5] і циклофіліну Д у матриксі [17]. Відомо, що на внутрішній мембрані мітохондрії діаметр пори становить 2 – 2,5 нм, а на зовнішній 2,5 – 3 нм [8], що дозволяє проходити через мітохондріальну мембрану сполукам масою до 1500 Да.

Показано, що пора відкривається при наявності відповідних умов: при окисненні SH - груп білків та великій концентрації Ca^{2+} усередині мітохондрій. Ca^{2+} є фундаментальним активатором МП, збільшення його концентрації у цитозолі до 1 мкмоль/л може бути тригером її відкриття [4,9,16]. З літератури відомо, що неорганічний фосфат разом з Ca^{2+} може

виступати активатором МП [8]. Її відкриття спричинюють також оксидативний стрес і вільні радикали, що при цьому утворюються [19,25].

Відкриття пори супроводжується виходом із мітохондрій цілої низки відомих речовин (наприклад цитохром С; фактор індукції апоптозу тощо) і тих, роль яких залишається невивченою. Ці метаболіти запускають процес розвитку порушень у клітинному обміні, що призводять до апоптозу чи некрозу клітини. З іншого боку, вихід сполук, що звичайно знаходяться в мітохондріях, у цитозоль чи навіть позаклітинний простір і в відтікаючий розчин (кров) може свідчити про відкриття МП. Особливо важливо реєструвати такі сполуки у відтікаючому від ізольованого органа розчині або крові, що дасть можливість визначити відкриття пори *in situ* та *in vivo*, та порівняти це з показниками функціональної активності досліджуваних органів.

Показано, що постреперфузійні порушення діяльності серця пов'язані зі зміною проникливості мітохондріальної мембрани кардіоміоцитів внаслідок утворення МП [7]. Дані наших попередніх досліджень [1] свідчать, що при реперфузії ізольованого серця морських свинок у відтікаючий розчин вивільнюються сполуки, які спричинюють порушення серцевого ритму та пригнічення скорочувальної активності міокарда.

Мета нашої роботи – спроба показати, що ці сполуки можуть реєструватись у відтікаючому від серця розчині і бути маркером відкриття МП.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на ізольованих серцях морських свинок масою 350 – 450 г. Перфузію коронарних судин здійснювали за методом Лангендорфа в умовах постійного тиску при 37 °С розчином наступ-

ного складу (в ммоль/л): NaCl - 118; KCl - 4,7; MgSO₄ - 1,2; NaHCO₃ - 24; KH₂PO₄ - 1,2; глюкоза - 10; CaCl₂ - 2,5. Перфузійний розчин аерували карбогеном (95 % O₂ і 5 % CO₂). Тиск у порожнині лівого шлуночка – розвинутий тиск - (P_p) та кінцево-діастолічний тиск (КДТ) – вимірювали за допомогою латексного балончика тензодатчиками 746 і реєстрували на багатоканальному полікардіографі «Мінгограф-82» («Елема», Швеція). Скорочувальну активність лівого шлуночка оцінювали за значеннями dP/dt_{max} і dP/dt_{min}, розраховували індекс скоротливості Верругута. Величину коронарного потоку вимірювали за об'ємом відтікаючого від ізольованого серця перфузійного розчину за 1 хв.

Напруження кисню у притікаючому і відтікаючому від серця перфузійному розчині вимірювали за допомогою газоаналізатора BMS 3 Mk 2. Розраховували об'єм споживання кисню за методом Neely [20] та кисневу вартість роботи серця за співвідношенням споживання кисню та тиску, який розвивав лівий шлуночок.

Спектрофотометричний аналіз проб відтікаючого від серця розчину проводили на спектрофотометрі СФ-46.

Відкриття МП викликали за допомогою оксидативного стресу внаслідок ішемії – реперфузії чи перфузії протягом 10 хв феніларсиноксиду (ФАО) або антимицину А у дозі 10⁻⁵ та 2 · 10⁻⁵ моль/л відповідно. Ішемію – реперфузію моделювали за допомогою повної зупинки перфузії серця на 20 хв і наступної реперфузії впродовж 40 хв. Реєстрацію досліджуваних показників проводили через кожні 5 хв спостереження.

Для пригнічення утворення МП використовували водорозчинний вітамін Е - тролокс («Sigma»; США) та циклоспорин А («Sigma»; США), які додавали до перфузійного розчину та перфузували протягом 10 хв у дозі 5 · 10⁻⁵ та 10⁻⁶ моль/л відповідно,

після чого моделювали тотальну 20-хвилинну ішемію. Крім того, тролокс вводили 10 mg/kg у дозі 10 mg/kg за 50 хв до виділення серця, далі ішемія – реперфузія за схемою.

Статистичну обробку результатів проводили методом різниць за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як показали наші дослідження реперфузія ізольованого серця після 20-хвилинної ішемії призводить до коронаростриктії, пригнічення скоротливої активності міокарда, аритмії та неефективного використання тканинами кисню [1]. Аналіз відтікаючого від серця розчину за допомогою спектрофотометрії показав, що в розчині, зібраному в перші хвилини реперфузії міокарда в ультрафіолетовій ділянці спектра на $\lambda = 250 \text{ nm}$ спостерігалось збільшення оптичної щільності поглинання, амплітуда якого становила $0,11 \pm 0,014$, що вказувало на наявність у розчині певної речовини. Аналіз проб на 10, 20, 30 і 40-ву хвилини реперфузії показав суттєве зменшення амплітуди піків оптичної щільності поглинання (рис.1) Слід зазначити, що до ішемії останні були відсутні. В експериментах на наркотизованих собаках і кролях нами було зафіксовано появу вказаної речовини у відтікаючій від ішемізованої кінцівки крові після початку її реперфузії. У пробах, зібраних після ішемії – реперфузії ізольованого серця кролів, а також у відтікаючій від ішемізованого серця крові собак також було зареєстровано вихід

знайденого нами фактора, що свідчить про його універсальний характер.

Якщо фактор вивільнюється при відкритті МП, цілком логічно припустити, що при активації оксидативного стресу за допомогою введення ФАО чи антиміцину А, при якому відкривається МП, ми теж будемо спостерігати появу піка поглинання оптичної щільності на довжині хвилі $240 - 250 \text{ nm}$.

Відомо, що в культурі кардіоміоцитів ФАО стимулював відкриття МП, яке супроводжувалося поступовим розвитком гіперконтрактури клітин за допомогою підвищення чутливості міофібрил до Ca^{2+} та збільшенням потоку Ca^{2+} з мітохондрій у цитозоль крізь МП [18]. Тому в експериментах ми використовували ФАО для відкриття МП. Введення ФАО в перфузат ізольованого серця призводило як і при

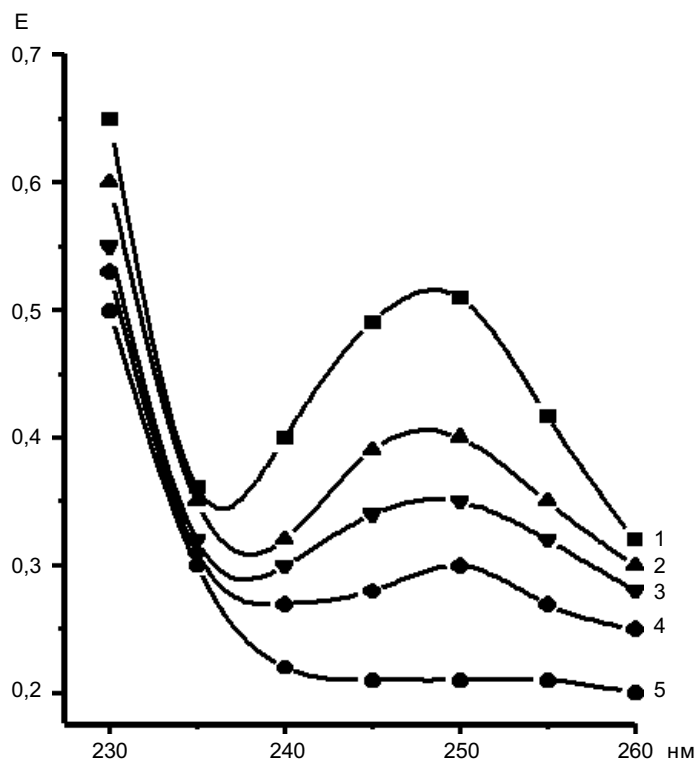


Рис.1 Зміни оптичної щільності поглинання розчину, відтікаючого від легеневої артерії ізольованого серця морської свинки під час реперфузії на 1-й (1), 5-й (2), 20-й (3), 40-й (4) хвилині та до ішемії (5).

реперфузії до коронаростриктії, пригнічення скорочувальної активності міокарда та неефективного використання кисню. У пробах розчину, що відтікав від коронарних судин, зібраних на 10-й хвилині перфузії ФАО, пік поглинання не реєструвався, а у пробах, отриманих на 5 – 10-й хвилинах після припинення перфузії ФАО, спостерігали появу зареєстрованого нами фактора. Величина піка у цих експериментах на морських свинках була меншою, ніж в перші хвилини реперфузії. Перфузія ФАО в ліву коронарну артерію наркотизованих собак також супроводжувалася появою у відтікаючій крові (з правого шлуночка серця) зареєстрованого нами фактора.

Перфузія ізольованого серця морських свинок ще одним активатором оксидативного стресу – відомим інгібітором дихального ланцюга – антиміцином А у дозі $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л протягом 10 хв супроводжувалася порушеннями кардіодинаміки та скорочувальної активності міокарда. Спектрофотометричні дослідження свідчили, що антиміцин А також стимулював появу у відтікаючому розчині досліджуваного фактора – пік оптичної щільності поглинання реєструвався на 5-й хвилині після припинення перфузії препарату та становив $0,12 \pm 0,005$. Таким чином, активація оксидативного стресу за допомогою реперфузії ішемізованого серця та введення ФАО чи антиміцину А, які, як відомо [18], призводять до відкриття МП, супроводжувалася вивільненням зареєстрованого нами фактора. За допомогою спектрофотометричного методу виділення фактора виявлено у різних тварин (морські свинки, кролі, собаки) та при дії різних “відкривачів” МП. Це дає підстави вважати, що знайдений нами фактор може бути маркером відкриття МП.

Підтвердження такого припущення ми знайшли в експериментах із застосуванням інгібіторів відкриття МП. Відомо, що одним із найбільш ефективних блокувальних

МП є циклоспорин А, який зв’язує циклофілін D – один із структурних елементів пори. В публікаціях останнього часу з’явилась інформація, що водорозчинний вітамін Е (тролокс), відомий як інгібітор оксидативного стресу [22], також може виступати інгібітором відкриття МП та виходу в цитозоль значної кількості вільних радикалів кисню [25]. Це збігається і з результатами власних досліджень [2,3]. Саме відкриття МП спостерігалось при реперфузії ішемізованого серця [13], а попередження відкриття пори циклоспорином А [12], а також тролоксом [2] запобігало порушенню функції ізольованого серця при реперфузії.

Результати наших досліджень свідчать, що амплітуда піка змін оптичної щільності поглинання при спектрі 240-250 нм у пробах, що були зібрані на 1 – 2-й хвилинах реперфузії після ішемії на фоні попереднього введення тролоксу per os, становила $0,046 \pm 0,01$, тобто 40 % відносно величини піка поглинання за умов “чистої” ішемії – реперфузії (рис.2), а на фоні попереднього введення циклоспорино А, $0,027 \pm 0,01$ відповідно, тобто 24 %. Суттєве зменшення порушень діяльності серця та кисневого обміну, які викликала тотальна 20-хвилинна ішемія та наступна реперфузія міокарда після введення тролоксу та циклоспорино А корелювали зі зменшенням амплітуди піка змін оптичної щільності поглинання відтікаючого розчину. Коефіцієнт кореляції між амплітудою піка поглинання та величиною тиску у лівому шлуночку на 5-й хвилині реперфузії становив 0,987, а кисневої вартості роботи міокарда – 0,977 на 5-й хвилині та 0,999 – на 40-й хвилині реперфузії. Цей факт дає можливість зробити припущення, що величина піка відображає концентрацію фактора, який вивільнюється з мітохондрій та призводить до спостережуваних порушень діяльності серця та кисневого обміну. Ці результати свідчать, що

блокатори МП суттєво зменшують вихід фактора після ішемії – реперфузії та підтверджують припущення, що пік поглинання на 240-250 нм може бути маркером відкриття МП, а його амплітуда може непрямо свідчити про ступінь пошкодження клітин.

Ще одним підтвердженням мітохондріального походження сполук, що з'явля-

ються у відтікаючому від ізольованого серця розчині чи крові тварин при дії агентів, які призводять до відкриття МП, є реєстрація вказаного фактора в суспензії ізольованих мітохондрій при дії ФАО та при аноксії – реоксигенації [3]. В цих експериментах індуковане ФАО вивільнення фактора практично повністю пригнічувалось, як і в дослідях на ізольованому

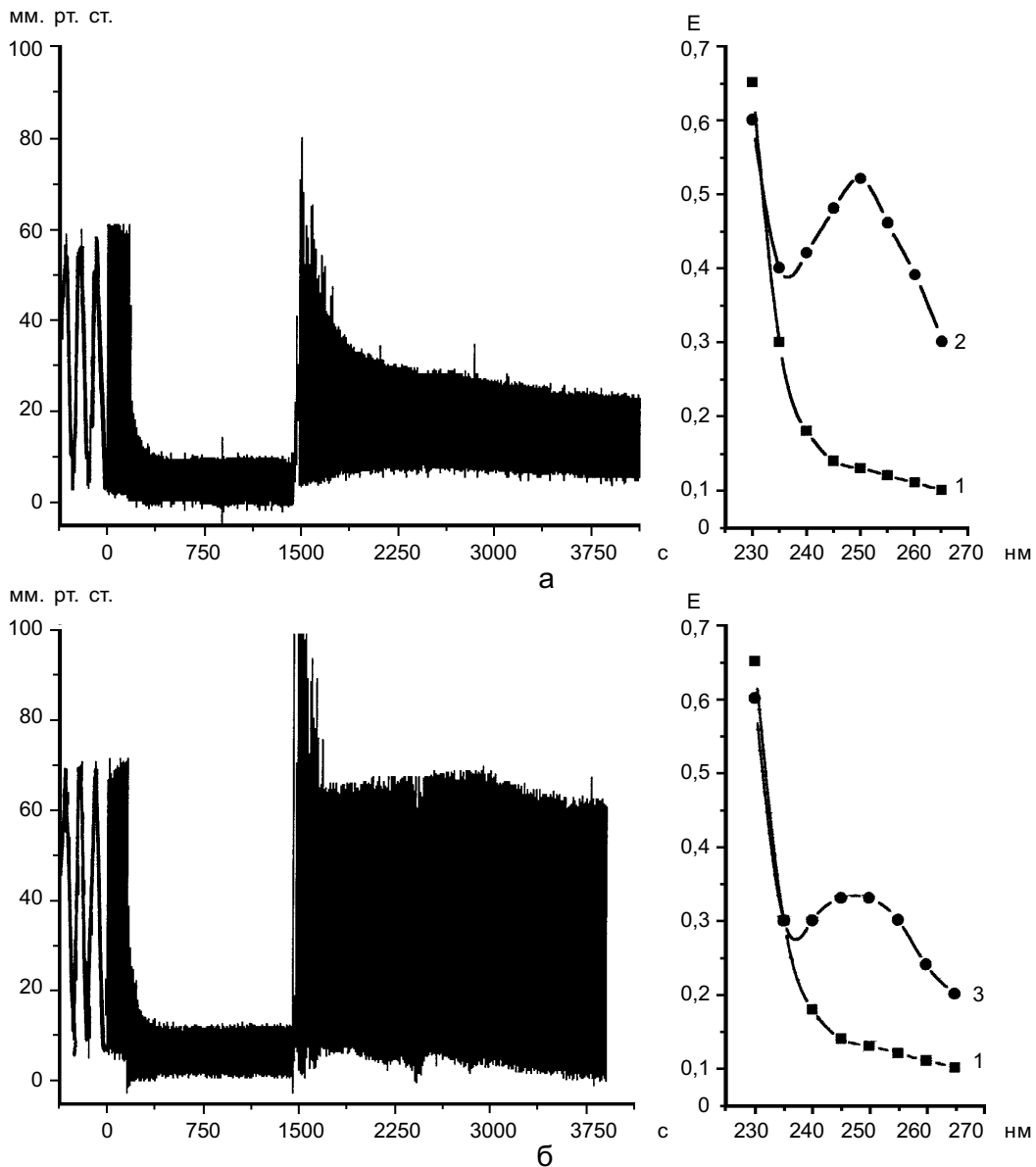


Рис.2. Зміни тиску у лівому шлуночку та амплітуди оптичної щільності поглинання відтікаючого розчину протягом ішемії – реперфузії контрольних тварин (а) та після попереднього введення тролоксу рег ос (б). 1 – контроль, 2 – реперфузія, 3 – тролокс та реперфузія

серці, класичним інгібітором МП циклоспорином А, що свідчило на користь причетності відкриття пори до вивільнення зареєстрованого нами фактора. Також як і в експериментах на ізольованому серці показана протекторна дія на виділення фактора антиоксидантів тролоксу та мелатоніну, реагента на SH-групи – дитіотрієтолу та скавенжеру глутатіону – діетилмалеату.

З метою з'ясування деяких характеристик фактора ми також провели низку досліджень, в яких відтікаючий розчин, зібраний за перші 5 хв реперфузії, зберігали при кімнатній температурі впродовж 1-ї доби, а потім перфузували ним інтактне серце, що супроводжувалось як і при реперфузії аритмогенним та кардіодепресорним ефектами. Пік збільшення оптичної щільності поглинання проб на хвилі 240-250 нм зберігався при нагріванні проб і витримуванні їх разом з кислотою, що свідчило про стабільність фактора.

У 1997 р. S.V.Felix та співавт. [10], навели дані про вивільнення під час реперфузії стабільного кардіодепресорного медіатора, що мав характеристики, схожі до знайденого нами фактора. Автори показали, що він мав небілкову природу, молекулярну вагу близько 500 Да і не втрачав своїх властивостей упродовж 1-ї доби зберігання при кімнатній температурі. В результаті подальших досліджень вони з'ясували, що його кардіодепресорний ефект був зумовлений здатністю блокувати L-тип кальцієвих каналів. Останнє супроводжувалося зменшенням входу кальцію в кардіоміоцити та зменшенням амплітуди міокардіальних скорочень [11]. Результати наведені Zhao-Kang Y. та співавт. свідчили про Ca^{2+} -незалежне пригнічення скорочувальної функції ізольованих кардіоміоцитів відтікаючим розчином від серця, яке працювало за умов гіпоксії, внаслідок зниження чутливості скоротливих білків до Ca^{2+} [24]. Природа цього

медіатора лишилася нез'ясованою. Невідома природа і фактора, зареєстрованого нами. Хоча в літературі описано [23], що мітохондрії можуть вмщати деякі нітрозосполуки, спектр поглинання яких в ультрафіолетовій ділянці на хвилі 250 нм, а саме нітрозоглутатіон. Наші експерименти на ізольованому серці з попереднім введенням діетилмалеату – скавенжера глутатіону – перед ішемією – реперфузією в дозі 20 мкмоль/л показали, що амплітуда піка поглинання на $\lambda=250\text{нм}$, який ми реєстрували при ішемії – реперфузії, суттєво знижувалась, а при застосуванні дози 200 мкмоль/л пік зовсім не реєструвався. Ймовірно, що однією зі “складових частин” фактора може бути глутатіон, а саме нітрозоглутатіон, оскільки відомо, що він має і неспецифічний пік поглинання при 250 нм. Якою б не була природа знайденого фактора результати наших досліджень свідчать, що він досить стійкий, вивільнюється у відтікаючий розчин або кров і може бути маркером відкриття МП в експериментах *in vitro* та *in vivo*.

V.F. Sagach, T.V. Shymanskaya, S.M. Nadtochiy

FACTOR RELEASED UNDER HEART REPERFUSION MAY BE THE MARKER OF OPENING OF THE MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE

In experiments on isolated hearts of guinea-pigs, on a model of ishaemia- reperfusion cardiac reperfusion has been shown to result in a constriction of coronary vessels, arrhythmia, an inhibition of the contractile activity of the myocardium, and an increase in an oxygen cost of the myocardial work. Apart from that, a stable agent was detected in a reperfusion solution by spectrophotometry on the wave length of 250 nM. Similar deterioration of the heart function and the availability of the stable agent in the solution were observed under influence of the known activators of mitochondrial permeability transition pore - phenylarsine oxide and antimycin A. In anaesthetized animals a release of the stable factor into the blood was induced by either ishaemia - reperfusion or those activators. Application of the known inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore cyclosporin A or trolox (water-soluble vitamin E) decreased remarkably both the cardiodynamic deterioration and a release of the stable factor under heart reperfusion. Mitochondrial origin of the factor

was confirmed in experiments on isolated mitochondria. Thus, the detected factor has been determined to be released from mitochondria at the opening of mitochondrial permeability transition pore and is thought to be the marker of its opening in experiments in vitro and in vivo.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сагач В.Ф., Дмитрієва А.В., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, дослідження впливу на міокард, коронарні та периферичні судини // *Фізіол. журн.* – 2002. – **48**, №1. – С.3 – 8.
2. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Попередження постреперфузійних порушень функції серця та неефективного використання кисню за допомогою інгібіторів МП // *Там само.* – 2002. – **48**, №6. – С.3 – 9.
3. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Аكوпова О.В. Вплив індукторів та інгібіторів МП на її утворення та на вивільнення неідентифікованого мітохондріального фактора // *Там само.* – 2003. – **49**, №1. – С.3 – 12.
4. Al Nasser I., Crompton M. The reversible Ca-induced permeabilization of rat liver mitochondria // *Biochem. J.* – 1986. – **239**. – P.19 – 26.
5. Brdiczka D. Contact sites between mitochondrial envelope membranes // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 1991. – **1071**. – P.291 – 312.
6. Colombini M., Blachly-Dyson E., Forte M. VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane // *Ion Channels.* – 1996. – 4. – P.169 – 202.
7. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // *Biochem. J.* – 1999. – **341**. – P.233 – 249.
8. Crompton M., Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca overload // *Euor. J. Biochem.* – 1988. – **178**. – P.489 – 501.
9. Duchon M., McGuinness O., Brown L., Crompton M. On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury // *Cardiovasc. Res.* – 1993. – **27**. – P.1790 – 1794.
10. Felix S.B., Stangl V., Frank T.M., Harms C. et al. Release of a stable cardiodepressant mediator after myocardial ischemia during reperfusion // *Ibid.* – 1997. – **35**. – P.68 – 79.
11. Felix S.B., Stangl V., Pietsch P. et al. Soluble substances released from postischemic reperfused hearts reduce calcium transient and contractility by blocking the L-type calcium channel // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2001. – **37**, №2. – P.668 – 675.
12. Griffiths E., Halestrap A. Protection by cyclosporin A of ischaemia/reperfusion induced damage in isolated heart // *J.Mol.Cell.Cardiol.* – 1993. – **25**. – P.1461 – 1469.
13. Griffiths E., Halestrap A. Mitochondrial non specific pores remain closed during cardiac ischaemia but open upon reperfusion // *Biochem.J.* – 1995. – **307**. – P.93 – 98.
14. Halestrap A., Kerr P., Javadov S., Woodfield K. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – **1366**. – P.79 – 94.
15. Hodge T., Colombini M. Regulation of metabolite flux through voltage – gating of VDAC channels // *J. Mem. Biol.* – 1997. – **157**. – P.271 – 279.
16. Hunter P., Haworth R., Southard J. Relationship between configuration, function and permeability in calcium – treated mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 1976. – **251**. – P.5069 – 5077.
17. Jonson N., Khan A., Virji S. et al. Import and processing of heart mitochondrial cyclophilin-D // *Europ. J. Biochem.* – 1999. – **263**. – P.353 – 359.
18. Korge P., Goldhaber J., Weiss J. Phenylarsine oxide induces mitochondrial permeability transition, hypercontracture, and cardiac cell death // *Amer.J.Physiol.* – 2001. – **280**. – P.H2203 – H2213.
19. Kowaltowski A., Castilho R.F., Vercesi A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress // *FEBS Lett.* – 2001. – 495. – P.12 – 15.
20. Neely J. R., Liebermeister H., Battersby E. J. et al. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated heart // *Amer.J.Physiol.*, – 1967. – **221**. – P.804 – 813.
21. Petronilli V., Costantini P., Scorrano L. et al. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**. – P.16638 – 16642.
22. Sagach V., Scrosati M., Fielding J. et al. The water-soluble vitamin E analogue trolox protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and ex vivo. A comparison with vitamin E // *Pharmacol.Res.* – 2002. – **45**. – P.435 – 439.
23. Steffen M., Sarkela M.S., Gybina A.A. et al. Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria // *Biochem.J.* – 2001. – **356**. – P.395 – 402.
24. Zhao-Kang Y., Draper N.J., Shah A.M. Ca²⁺-independent inhibition of myocardial contraction by coronary effluent of hypoxic rat hearts // *Amer. J.Physiol.* – 1999. – **276**. – P.H623 – H632.
25. Zorov D.B., Filburn C.R., Klotz L-O. et al. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes // *J.Exp.Med.* – 2000. – **192**, №7. – P.1001 – 1014.

Ин-т фізіології ім О.О.Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 13.06.2003