

С.М. Надточій, А.Ю. Богуславський, В.Ф. Сагач

Визначення стабільного фактора мітохондріального походження *in vivo*

В опытах in vivo было показано, что в условиях ишемии – реперфузии миокарда и при развитии оксидативного стресса в тканях задней конечности с помощью активатора митохондриальных пор фениларсиноксида (ФАО) в кровотоке выделяется стабильный фактор митохондриального происхождения. Фактор спектрофотометрически регистрировали в сывортке крови в ультрафиолетовом диапазоне волн (230 – 260 нм). О его наличии свидетельствовало повышение оптической плотности при длине волн от 240 до 250 нм. Выделение фактора после реперфузии миокарда сопровождалось угнетением сократительной функции сердца, развитием нарушений кардиодинамики и регионарного кровообращения. Полученные результаты говорят о том, что стабильный митохондриальный фактор может быть использован как маркер оксидативных повреждений в целостном организме.

ВСТУП

За останнє десятиріччя з'явилися факти, котрі свідчать про вивільнення з ендотеліальних/ендокардіальних клітин і кардіоміоцитів хімічно неідентифікованих факторів, які активно впливають на скорочувальну активність міокарда. У дослідженнях [11] було показано, що фактори, які утворювалися під час гіпоксії, пригнічували скорочувальну активність кардіоміоцитів через зменшення чутливості скорочувальних білків до Ca^{2+} . Інші автори вказують, що під час ішемії – реперфузії ізольованого серця утворюються кардіодепресорні фактори, здатні пригнічувати скорочувальну активність другого суперфузованого серця [6, 12]. Наші власні дослідження показали, що стабільний фактор утворюється під час оксидативного стресу [1], який пов'язаний з порушенням окисного фосфорилування в мітохондріях і відкриттям мітохондріальних пор (МП). Утворення їх є одним з ключових факторів у пошкодженні серцево-судинної системи під час ішемії – реперфузії серця або під

впливом біологічно активних речовин [4, 7]. МП являє собою неселективний канал у мембранах мітохондрії, крізь який у цитозоль клітини може виходити цілий спектр низькомолекулярних речовин (молекулярна маса понад 1500 Да), структура та функціональна роль більшості з яких поки що невідома [5, 8, 10]. Однак доведено, що цитохром с мітохондріального походження бере участь у розвитку апоптозу та некрозу клітин [9].

У дослідах на ізольованих за методом Лангендорфа серцях морських свинок показано, що під час реперфузії ішемізованого серця у відтікаючий розчин вивільнюється стабільний фактор, який реєструється спектрофотометрично в діапазоні довжин хвиль 230 – 260 нм з максимумом поглинання 240 – 250 нм [3]. Стабільна речовина також вивільнювалася при дії на ізольоване серце активаторів МП феніл-арсиноксиду (ФАО) і антимицину А. Інгібітори утворення МП циклоспорин А і тролокс блокували вихід стабільного фак-

тора у відтікаючий розчин. Спостерігалася кореляційна залежність між амплітудою підвищення оптичної густини відтікаючого розчину і ступенем пригнічення показників кардіодинаміки, скоротливої активності та коронарного потоку ізольованого серця [3]. Досліди *in vitro* на ізольованих мітохондріях з аноксією і ФАО підтвердили мітохондріальне походження стабільного фактора [2]. Таким чином, вивільнення мітохондріального стабільного фактора (МСФ) може розглядатися як маркер активації МП за умов *in situ*, амплітуда якого відповідає мірі пошкодження функції серця.

Такі характеристики фактора, як здатність виходити з пошкоджених клітин при активації МП, проходити через судинну стінку та з'являтися у відтікаючому від ізольованого серця розчині [3], дають підстави для дослідження можливості його реєстрації в кровотоці тварин і використання як маркера відкриття МП *in vivo*.

Метою нашого дослідження було визначення наявності стабільного фактора мітохондріального походження у крові тварин під час ішемії – реперфузії серця та під впливом активатора МП у венозних судинах задньої кінцівки.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на 12 безпородних собаках під хлоралозо-уретановим наркозом (0,05 та 0,5 г/кг внутрішньовенно) з премедикацією кетаміном (5 мг/кг внутрішньом'язово). Як антикоагулянт використовували гепарин у дозі 500 од./кг.

Досліди здійснювали за умов, максимально наближених до фізіологічних – без розтину грудної порожнини при збереженні самостійного дихання. Під час операційної підготовки відпрепарували та катетеризували: загальні сонні артерії, праву яремну вену, праву підключичну

артерію, праві стегнові артерію і вену, а також проводили катетеризацію й аутоперфузію кров'ю коронарних судин без відкриття грудної клітки. Для катетеризації та аутоперфузії коронарних судин було змонтовано спеціальну систему: спочатку катетеризували праву підключичну артерію, а потім послідовно приєднували датчик флоуметра, відгалуження до датчика тиску і металевий тонкостінний катетер з obturatorом на кінчику. Металевий катетер проводили через праву сонну артерію у висхідну аорту до аортальних клапанів і заводили його в устя лівої коронарної артерії до заклинення, що супроводжувалося падінням тиску в системі до 15 – 25 мм рт.ст. Швидко відновлювали кровопостачання коронарної артерії по катетеру та реєстрували перфузійний тиск за допомогою тензодатчика 746 (“Elema”, Швеція), а також коронарний кровотік за допомогою електромагнітного флоуметра РКЕ-2-БІ. Розраховували системний артеріальний тиск (САТ) і коронарний опір.

Порожнину лівого шлуночка катетеризували через ліву загальну сонну артерію. Впродовж експеримента реєстрували тиск у порожнині лівого шлуночка (ТЛШ) та його першу похідну (dP/dt) за допомогою тензодатчика 746 (“Elema”, Швеція). Визначали частоту серцевих скорочень, кінцево-діастолічний тиск (КДТ), показники скорочувальної активності міокарда (dP/dt_{max} , dP/dt_{min} , індекс Верагута та індекс розслаблення).

Також реєстрували у стегновій артерії тиск за допомогою тензодатчика 746 (“Elema”, Швеція) та кровотік за допомогою електромагнітного флоуметра РКЕ-2-БІ. Розраховували судинний опір у басейні стегнової артерії.

Проміжні результати та оригінальні записи показників кардіодинаміки обробляли за допомогою програм ORIGIN 6.0 та Global Lab V2.4.

Модель ішемії – реперфузії міокарда відтворювали повною зупинкою перфузії однієї з гілок лівої коронарної артерії на 20 хв з наступною 40-хвилинною реперфузією. Проби крові відбирали через катетер з правого передсердя до ішемії, на 15-й хвилині ішемії та на 1–5-х хвилинах реперфузії.

З метою активації МП у тканинах стегна використовували феніларсин оксид (ФАО, “Sigma”, США) в дозі 0,4 мг [8]. Препарат, розчинений у 20 мл фізіологічного розчину, повільно вводили в стегнову артерію, за умов зупинки кровопостачання на 5 хв, з наступним відновленням кровотоку. Проби крові відбирали зі стегнової вени до введення препарату, а також безпосередньо після відновлення кровотоку в басейні стегнової артерії.

Проби крові центрифугували при 3000 хв^{-1} протягом 10 хв. Сироватку відбирали піпеткою і додавали трихлороцтову кислоту. Для забезпечення повного осадження білків змішували 1мл сироватки з 0,1 мл 50%-ї трихлороцтової кислоти. Розчин ретельно перемішували скляною паличкою і залишали на 10 хв. Потім центрифугували при 3000 хв^{-1} протягом 15 хв. Після цього обережно видаляли осад і проводили спектрофотометричні вимірювання розчину.

Оптичну густину розчинів досліджували в ультрафіолетовій ділянці спектра при довжинах хвиль від 230 до 260 нм за допомогою спектрофотометра СФ-46 з використанням кварцевих 10-міліметрових кювет. Функціональну криву залежності оптичної густини поглинання від довжини хвилі будували за допомогою програми ORIGIN 6.0.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дослідах на собаках 20-хвилинна оклюзія однієї з гілок лівої коронарної артерії і наступна реперфузія призводили до сут-

тєвого зменшення САТ, показників кардіодинаміки та скорочувальної активності міокарда. На 20-й хвилині реперфузії відбувалося значне зменшення САТ. ТШЛ знижувався протягом усього періоду ішемії і був нижчим за контроль впродовж наступної реперфузії (рис.1). Цікаво, що в багатьох експериментах цей показник уже на 20-й хвилині реперфузії дещо відновлювався і становив майже 80% від вихідного рівня. Проте зменшення ТШЛ відбувалося меншою мірою, ніж скорочувальна активність міокарда.

dP/dt_{\max} на 20-й хвилині ішемії вірогідно знижувалась і це тривало протягом подальшої реперфузії. Аналогічно змінювався індекс Верагута, який на 20-й хвилині реперфузії зменшувався майже в 2 рази. Слід зазначити, що показники розслаблення міокарда під час реперфузії пригнічувалися більш істотно, ніж показники скорочувальної активності. Вже на 5-й хвилині реперфузії значення dp/dt_{\min} знижувалося більш ніж удвічі. Причому відновлення цього показника протягом реперфузії не відбувалося (див. рис.1). Значне підвищення КДТ (на 90% наприкінці ішемії) і зниження індексів скорочувальної активності протягом ішемії і, особливо, під час реперфузії свідчать про виразне ушкодження міокарда. Значне зменшення коронарного кровотоку, яке спостерігалось при реперфузії міокарда, може бути одним із чинників, який посилював ушкодження серця.

Таким чином, характер зміни показників кардіодинаміки, скорочувальної активності міокарда та коронарного кровотоку свідчить про значне ураження серця, яке розвивається при ішемії – реперфузії. Ступінь депресії скорочувальної активності серця в наших дослідах цілком збігається з даними, які були отримані в експериментах на ізольованому серці [3].

У пробах крові, які забирали перед і під час ішемії не спостерігалось збільшення

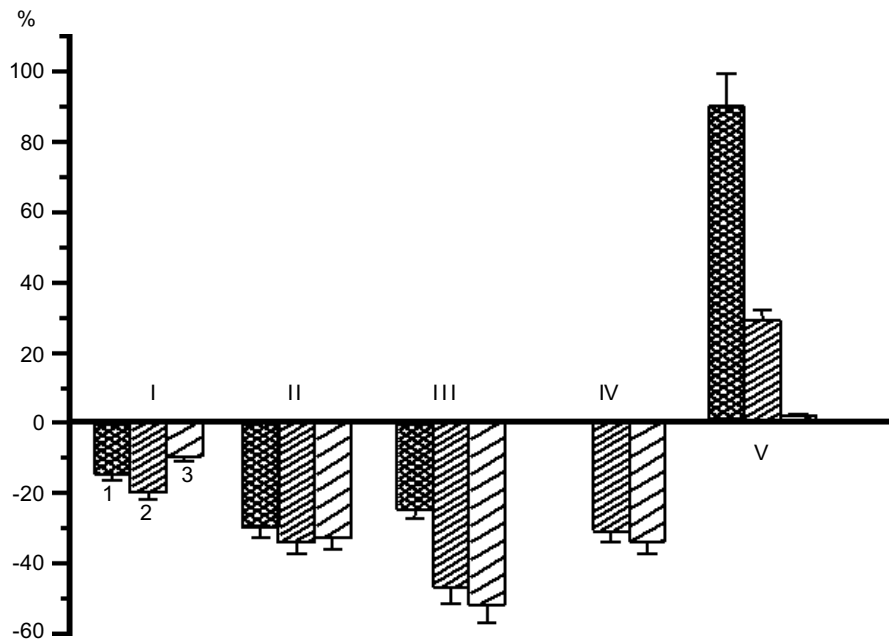


Рис. 1. Зміни показників кардіодинаміки та коронарного кровообігу собак при ішемії – реперфузії міокарда: I – 20-та хвилина ішемії, 2 – 5-та хвилина реперфузії, 3 – 20-та хвилина реперфузії; I – максимальний тиск у лівому шлуночку; II – dP/dt_{\max} ; III – dP/dt_{\min} ; IV – коронарний кровотік; V – кінцевий діастолічний тиск

оптичної густини поглинання при довжині хвиль від 240 до 250 нм. Це узгоджується з даними інших авторів, які продемонстрували активацію МП і вихід у цитозоль клітин метаболітів мітохондріального походження саме під час реперфузії, а не ішемії [7].

У пробах венозної крові, зібраних через 1 – 2 хв по відновленні кровотоку після оклюзії коронарної артерії, амплітуда збільшення оптичної густини сироватки становила $0,29 \pm 0,05$, а у пробах, зібраних на 3-й хвилині реперфузії міокарда, відбувалося даліше підвищення оптичної густини до $0,31 \pm 0,06$ (рис.2). Наведені результати дещо відрізняються від тих, які ми отримали на моделі ізольованого серця, де максимальне значення амплітуди підвищення оптичної густини зафіксовано на першій хвилині реперфузії [3]. Таким чином, ішемія – реперфузія міокарда за умов цілісного організму також супроводжувалася вивільненням у кровотік МСФ, мак-

симум якого спостерігався через 3 хв після відновлення кровопостачання, і може свідчити про активацію МП.

З метою перевірки можливості активації МП в інших типах тканин було досліджено вплив їх відкриття на регіонарну гемодинаміку шкіро-м'язової ділянки і можливість виявлення при цьому МСФ у відтікаючій венозній крові. Активацію МП на відміну від попереднього випадку здійснювали введенням ФАО в артеріальне русло задньої кінцівки.

Введення цієї речовини в стегнову артерію призводило до зниження в ній тиску і кровотоку. Вже на перших хвилинах після введення препарату артеріальний тиск поступово знижувався і на 15-й хвилині становив $106 \text{ мм рт.ст.} \pm 7,4 \text{ мм рт.ст.}$ порівняно з $131 \text{ мм рт.ст.} \pm 11,2 \text{ мм рт.ст.}$ у контролі ($P < 0,05$). При цьому кровотік у стегновій артерії зменшувався з $49 \pm 7,3$ до $29,6 \text{ мл/хв} \pm 3,9 \text{ мл/хв}$ ($P < 0,05$), а судинний опір підвищувався з $2,97 \pm 0,36$ до $3,75 \text{ мм}$

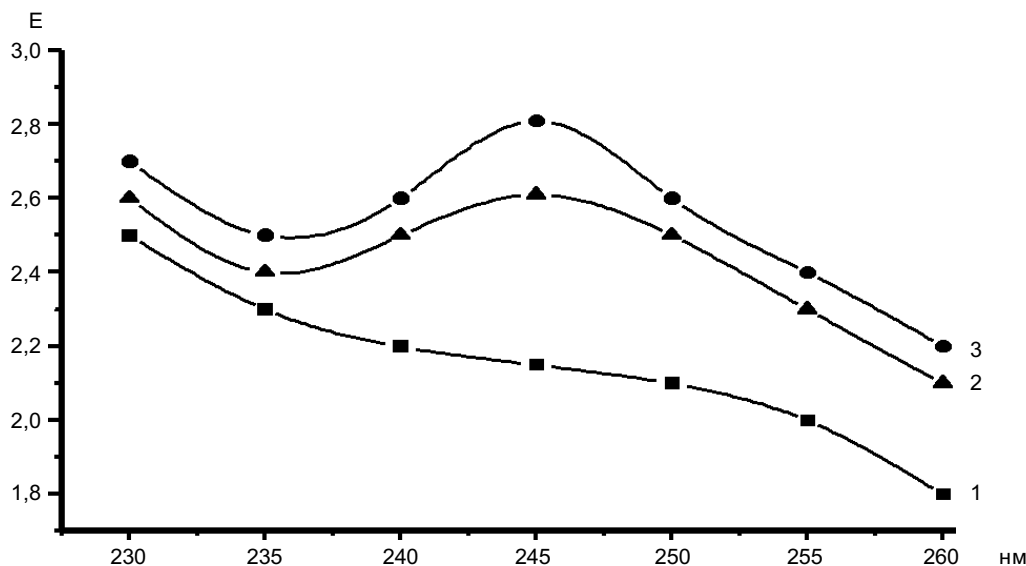


Рис. 2. Зміни амплітуди оптичної густини в пробах крові при застосуванні активаторів мітохондріальної пори: 1 – контроль; 2 – проби зібрані зі стегнової вени при відновленні кровотоку після введення фенілерсиноксиду (0,4 мг); 3 – проби зібрані на 3-й хвилині реперфузії міокарда

рт.ст. · мл⁻¹ · хв⁻¹ ± 0,49 мм рт.ст. · мл⁻¹ · хв⁻¹. Як видно з отриманих результатів, основною причиною зниження артеріального кровотоку є значне підвищення опору резистивних судин під дією ФАО, що призводить до погіршення перфузії м'язів стегна.

Розвиток порушень регіонарного кровообігу, зумовлений впливом ФАО, супроводжувався появою в пробах крові, зібраних зі стегнової вени при відновленні кровотоку, МСФ. Амплітуда підвищення оптичної густини в даному випадку становила 0,24±0,021 (див. рис. 2). Тобто активація МП у басейні стегнової артерії супроводжувалася порушенням регіонарної гемодинаміки і появою МСФ, який може бути маркером оксидативного пошкодження клітин.

Відомо, що в процесі тривалої гострої ішемії та гіпоксії в органах і тканинах утворюються і накопичуються різні біологічно активні речовини, які можуть брати участь у розвитку пошкоджень серця. Серед них є такі достатньо вивчені речовини, як серотонін, аденозин, гістамін, по-

хідні арахідонової кислоти, катехоламіни та інші, ефекти яких потужні, але швидкоплинні. Виявлений у наших досліджах МСФ принципово відрізняється від вищезгаданих речовин своєю стабільністю та здатністю зберігати біологічну активність протягом доби. Вивільнення МСФ у кровотік і можливість його реєстрації за умов *in vivo* дає змогу визначати відкриття МП у процесі розвитку патологічних станів, оцінити тяжкість порушень. Використання МСФ як маркера МП створює унікальні можливості для одночасного дослідження як функціонального стану організму, так і оцінки стану МП.

S.M. Nadtochiy, A.Y. Boguslavskiy, V.F. Sagach

DETERMINATION OF THE STABLE MITOCHONDRIAL FACTOR IN VIVO

We have determined a release of a stable mitochondrial factor (SMF) into the outflowing blood *in vivo*. That effect was induced by ischemia/reperfusion or phenylarsine oxide (PAO) - the activators of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) and the oxidative stress. The SMF was measured by a spectrophotometer in the range of wave-lengths

230-260 nm with the absorption maximum of 240-250 nm. The SMF release was accompanied with a decrease in the myocardial contractility, disturbances in cardiodynamics and regional blood circulation. The data obtained have demonstrated that the SMF can be used as a marker of MPTP opening in vivo.

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

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., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Аكوпова О.В. Вплив індукторів та інгібіторів мітохондріальної пори на її утворення та на вивільнення неідентифікованого мітохондріального фактора // *Там само.* – 2003. – **49**, №1. – С.3 – 12.
3. Сагач В.Ф., Шиманська Т.В., Надточій С.М. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори // *Там само.* – 2003. – **49**, №4. – С.6 – 12.
4. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // *Biochem. J.* – 1999. – **341**. – P.233 – 249.
5. Crompton M., Barksby E., Johnson N., Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death // *Biochimie.* – 2002. – **84**. – P.143 – 152.
6. Felix S.B., Stangl V., Frank T.M., Harms C., et al. Release of a stable cardiodepressant mediator after myocardial ischemia during reperfusion // *Cardiovasc. Res.* – 1997. – **35**. – P. 68 – 79.
7. Halestrap A., Mcstay G., Clarke S. The permeability transition pore complex: another view // *Biochimie.* – 2002. – **84**. – P.153 – 166.
8. Koge P., Goldhaber J., Weiss J. Phenylarsine oxide induces mitochondrial permeability transition, hypercontracture, and cardiac cell death // *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2001. – **280**. – P.H2203 – H2213.
9. Liu X., Kim C., Yang J., Jemmerson R., Wang X. Induction of the apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c // *Cell.* – 1996. – **86**. – P.147 – 157.
10. Ravagnan L., Roumier T., Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons // *J. Cell. Physiol.* – 2002. – **192**. – P.131 – 137.
11. Shah A. Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells // *Cardiovasc. Res.* – 1996. – **31**. – P.847 – 867.
12. Stangl V., Baumann G., Stangl K., Felix S.B. Negative inotropic mediators released from the heart after myocardial ischemia-reperfusion // *Ibid.* – 2002. – **53**, № 1. – P. 12 – 30.

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

Матеріал надійшов до редакції 31.07.2003