

А.М. Шиш, Т.В. Кукоба, Л.В.Тумановська, О.О. Мойбенко

## Модифікація жирнокислотного складу мембран як фактор захисту міокарда при стресорному його пошкодженні

*В експериментах на изолированных сердцах крыс исследовано влияние модификации жирнокислотного состава фосфолипидов клеточных мембран при помощи  $\omega$ -3 полиненасыщенных жирных кислот на характер адренергических реакций миокарда и перекисные процессы при остром иммобилизационном стрессе. Показано, что у животных с модифицированными мембранами при стрессе уменьшаются ультраструктурные изменения миокарда, ингибируются свободнорадикальные реакции, а также значительно снижаются адренергические реакции сердца.*

### ВСТУП

В останні десятиріччя значна увага дослідників приділяється вивченню ролі препаратів природного походження в лікуванні та профілактиці серцево-судинних захворювань. Особливе місце серед таких препаратів займають поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) із сімейства  $\omega$ -3, до яких належать ейкозапентаєнова (ЕПК) і докозагексаєнова (ДГК) кислоти, вживання яких знижує частоту розвитку ішемічної хвороби серця, гострого інфаркту міокарда, атеросклерозу, а також смертність від цих захворювань [4, 5, 13, 14]. Однак, незважаючи на те, що позитивний вплив препаратів на основі  $\omega$ -3 ПНЖК при захворюваннях серцево-судинної системи загально визнаний [8, 15], механізми їх протекторної дії вивчені недостатньо. Зокрема досить суперечливі літературні дані стосовно впливу  $\omega$ -3 ПНЖК на перекисні та антиоксидантні процеси [4, 9, 16], практично не описані зміни реактивності серця при модифікації жирнокислотного складу фосфоліпідного бішару мембран за патологічних умов. Також у літера-

турі відсутні дані щодо дослідження впливу  $\omega$ -3 ПНЖК на морфологічні зміни в серці за умов гострого стресу. Відомо, що стресорні впливи є важливими факторами розвитку серцево-судинної патології, тому вивчення дії препаратів, які містять  $\omega$ -3 ПНЖК і можуть застосовуватися у профілактичних цілях за умов гострого стресорного пошкодження серця, представляє особливий інтерес.

Мета нашої роботи – вивчення впливу модифікації жирнокислотного складу мембранних фосфоліпідів за допомогою  $\omega$ -3 ПНЖК на зміни ультраструктури міокарда, адренергічні реакції серця та перекисні процеси за умов гострого іммобілізаційного стресу.

### МЕТОДИКА

Експерименти проведено на щурах-самцях масою 280–300 г, яких було розподілено на 4 групи. До I контрольної (інтактні) групи ввійшли щури, яких утримували на стандартному раціоні віварію, до II – тварини, що попередньо отримували  $\omega$ -3 ПНЖК у вигляді препарату епадол (містить 45%  $\omega$ -3

ПНЖК), який додавали до повсякденного раціону (0,1 мл/100 г) протягом 4 тиж; до III – тварини, яких піддавали впливу гострого іммобілізаційного стресу (6 год фіксації на спині в стані нерухомості); до IV – тварини з гострим іммобілізаційним стресом, які попередньо отримували  $\omega$ -3 ПНЖК. Як критерій наявності стресу у тварин був підрахунок виразок на слизовій оболонці шлунка, збільшення маси наднирникових залоз та інволюція тимуса. Тварин анестезували уретаном (1,9 г/кг), відкривали грудну порожнину на рівні з'єднання ребер і груднини, видаляли серце й одразу поміщали його в льодяний розчин Кребса–Хензелейта. Серце підвішували на металеву канюлю, діаметр якої відповідав діаметрові аорти та перфузували ретроградно за класичним методом Лангендорфа буферним бікарбонатним розчином Кребса–Хензелейта [1]. Реактивність ізольованого серця щурів оцінювали за величиною адренергічної реакції при додаванні нор-адреналіну (від 0,1 до 1 мкмоль/л) у перфузуючий розчин. Процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) досліджували у гомогенатах сердець за допомогою методу індукованої хемілюмінесценції (ХЛ). Суть методу полягала в тому, що гомогенат міокарда вводили у вимірювальну камеру, яку розміщували над катодом ФЕУ-39А, далі вводили ініціюючу речовину – пероксид водню та протягом 5 хв реєстрували індуковану ХЛ за допомогою Хемілюмінографа ЕА-1. Кінетичні показники ХЛ та їх візуалізацію обробляли за спеціально розробленою програмою. Вимірювали такі показники: амплітуда швидкого спалаху ( $I_0$ ), кінцеве значення інтенсивності випромінювання ХЛ через 5 хв ( $I_5$ ), загальна світлосума за 5 хв ( $Y_5$ ). Для ультраструктурних досліджень використовувався рутинний метод заливки міокарда в епоксидні смоли з фіксацією зразків у 2,5%-му глютаральдегіді на какодилатному буфері та постфіксацією 1%-ю осміевою кисло-

тою. Ультратонкі зрізи контрастували в уранілацетаті та цитраті свинцю. Для визначення порушень цілісності сарколеми застосовували метод з використанням колоїдного лантану [6]. Матеріал вивчали на електронному мікроскопі Jem-100 CX (Японія).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати електронно-мікроскопічних досліджень дали змогу виявити деякі ультраструктурні порушення в окремих ділянках міокарда, які виникли в серці щурів після гострого іммобілізаційного стресу. Серед таких змін особливо слід виділити наявність контрактур або втрату міофіламентів характерної архітекtonіки внаслідок розпаду саркомерів, значний набряк мітохондрій з вираженою деструкцією внутрішньої мітохондріальної мембрани, зміни взаємної орієнтації цих органел, появу ознак деградації мембранних компонентів клітини (накопичення мієлінових фігур), набряк саркоплазматичного ретикулума, значне зменшення вмісту глікогену, вогнищеву вакуолізацію сарколеми. Використання колоїдного лантану дозволило нам переконливо показати, що сарколема окремих кардіоміоцитів (близько 10 % клітин) мала дефекти, бо в основному лантан накопичувався в клітинах (рис. 1 а, б). Відсутність глікогену в значній кількості кардіоміоцитів є ознакою наявності порушень кровообігу в окремих ділянках серця, можливо через коронарноконстрикцію, що може призводити до незворотного пошкодження кардіоміоцитів, внаслідок порушення цілісності сарколеми та деградації внутрішньоклітинних мембран, зокрема мембран мітохондрій. Значні контрактири в міокарді тварин, що піддавалися стресу, також свідчать про патологічні зміни в функціонуванні іонотранспортних систем кардіоміоцитів та

про перенавантаження клітин іонами кальцію [3]. Відомо, що під впливом пошкоджувальних факторів, що пов'язані зі стрес-реакцією – активацією ПОЛ, токсичною

дією надлишку катехоламінів, активацією лізосомальних ферментів, змінюється проникність клітинних мембран [2]. Зазначені порушення відображають патологічні зміни,

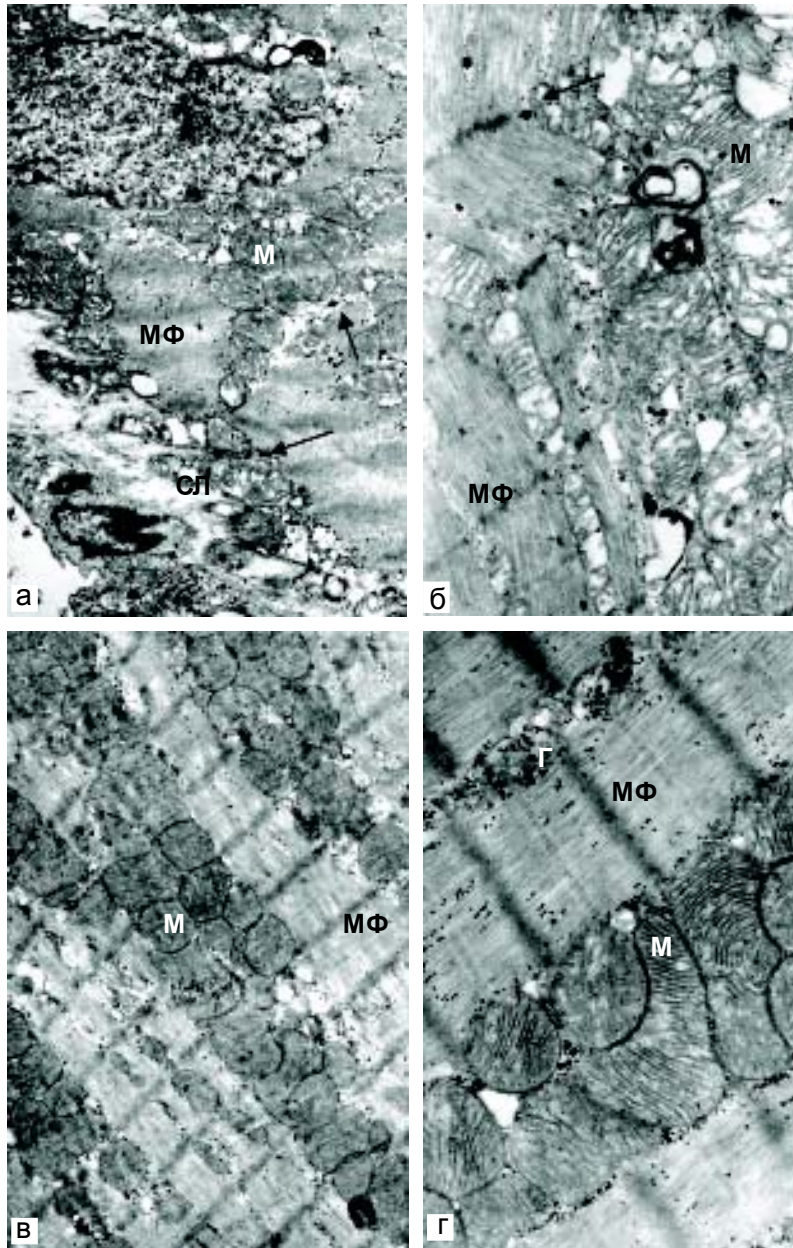


Рис.1. Вплив  $\omega$ -3 ПНЖК на ультраструктурні зміни в міокарді щура за умов гострого іммобілізаційного стресу: а, б – стрес (контрактури міофіламентів, набряк та руйнування мітохондрій, часткова відсутність глікогену, наявність лантану в клітині). Збільшення: а – 8000; б – 10000; в, г – стрес при попередньому застосуванні  $\omega$ -3 ПНЖК (збереження структури мітохондрій та міофіламентів, наявність глікогену). Збільшення : в – 8000; г – 14000. М – мітохондрії; МФ – міофібрили; СЛ – сарколема; Г – гранули глікогену; ( $\leftarrow$ ) – лантан

характерні для розвитку стресорної реакції, та свідчать про недостатність енергетичного забезпечення міокарда.

Модифікація жирнокислотного складу мембран кардіоміоцитів значною мірою попереджувала виникнення деструктивних змін у кардіоміоцитах. У міокарді тварин, при попередньому застосуванні  $\omega$ -3 ПНЖК, зберігалася внутрішньоклітинна архітектоніка, повністю були відсутні контрактири міофіламентів, проте міофібрили виглядали розслабленими, мітохондрії зберігали структуру та взаємну орієнтацію, не відмічалася втрата глікогену. Слід наголосити про відсутність лантану в клітинах, що свідчило про збереження цілісності їх сарколеми (див. рис. 1в, г). У результаті раніше проведених досліджень нами було показано, що застосування  $\omega$ -3 ПНЖК призводить до модифікації жирнокислотного складу фосфоліпідів клітинних мембран при заміщенні в них  $\omega$ -6 на  $\omega$ -3 ПНЖК [1]. Так, зокрема, після вживання  $\omega$ -3 ПНЖК протягом 4 тиж вміст арахідонової кислоти (АК) у тканині міокарда знижувався на 18,9 %, а вміст ЕПК збільшувався у 6,9 раза та ДГК у 1,4 раза порівняно з тими тваринами, що не вживали  $\omega$ -3 ПНЖК. Також спостерігалася збільшення співвідношення суми вмісту  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 ПНЖК у тканинах серця щурів після споживання епадолу на 45,4%. У цілому аналіз отриманого матеріалу підтверджує, що  $\omega$ -3 ПНЖК підвищують стійкість клітинних мембран до пошкоджувальної дії стресорних факторів. Основою цього, на нашу думку, є збереження цілісності клітинних мембран та значною мірою зменшення руйнування мітохондрій у кардіоміоцитах. Оскільки мітохондрії забезпечують процеси дихання та енергопостачання в клітині, ми можемо припустити, що збереження функцій мітохондрій, разом зі зменшенням руйнування сарколеми, зокрема її фосфоліпідного шару, є одним з важливих компонентів позитивного впливу  $\omega$ -3 ПНЖК. За даними літератури значна кількість  $\omega$ -3 ПНЖК знахо-

диться саме в фосфоліпідах мітохондрій і в саркоплазматичному ретикулумі серця [5]. Hallag і співавт. [11] показали, що ДГК модулює L-тип кальцієвих каналів у сарколемі кардіоміоцитів, що попереджає підвищення вмісту кальцію в цитозолі до токсичного рівня, регулює вхід і вихід кальцію для підтримання нормального скорочення кардіоміоцитів. Крім того, дослідження, проведені на ізольованому серці щура (рис. 2), свідчать, що введення норадреналіну у перфузат у зростаючих концентраціях у контролі призводило до дозозалежних змін тиску, який розвиває лівий шлуночок. Цей дозозалежний ефект зберігався і у щурів, які приймали  $\omega$ -3 ПНЖК. Однак адренергічні інотропні реакції сердець з модифікованими мембранами були значно слабшими порівняно з контролем. Так, при дії норадреналіну у дозі 0,1 мкмоль тиск у лівому шлуночку тварин II групи був меншим на 12,3 %, ( $P < 0,05$ ) а при дії 1 мкмоль – на 15,1%, ( $P < 0,05$ ) щодо контролю (див. рис. 2). Слід зазначити, що інтенсивність інотропних реакцій стресованих сердець з модифікованими мембранами на норадреналін (при використанні тих самих доз) була меншою на 36 і 18,4 % ( $P < 0,05$ ), ніж у контрольних тварин, які піддавалися стресу (див. рис. 2.). Також була зареєстрована різниця в часі реакції – за умов попереднього впливу  $\omega$ -3 ПНЖК реакція міокарда на норадреналін була коротшою. Отримані результати дозволяють стверджувати, що  $\omega$ -3 ПНЖК впливають на регуляцію серцевої відповіді на адренергічні впливи, зменшуючи реакцію серця, як на екзогенні, так і, вірогідно, на ендогенні катехоламіни, внаслідок модифікації жирнокислотної композиції мембран клітин серця. За даними інших дослідників, збільшення вмісту  $\omega$ -3 ПНЖК у складі фосфоліпідів клітинних мембран призводить до зниження вмісту тромбоксану  $A_2$ , збільшення вмісту простагліцину та сприяє вазодилататорному ефекту [7, 14]. Grynberg і співавт. [10] на культурі неонатальних кардіоміоцитів

встановили, що високий вміст ДГК у фосфоліпідах мембран кадміоцитів може знижувати афінність  $\beta$ -адренорецепторів до агоністів. Крім цього, клінічні дослідження свідчать, що  $\omega$ -3 ПНЖК пригнічують активність адреналової системи, яка викликається психогенним стресом, знижують рівень катехоламінів у плазмі та зменшують частоту серцевих скорочень при нервовому напруженні [8, 12]. Відомо, що блокада  $\beta$ -адренергічних впливів за умов патології серця, зокрема при гострому інфаркті міокарда, являє собою важливий фактор захисту ураженого серця [12]. Таким чином, зменшення інотропних реакцій серця на адренергічні впливи можна розглядати як один із можливих факторів кардіопротекції, викликаної модифікацією фосфоліпідних мембран за допомогою  $\omega$ -3 ПНЖК.

Дослідження вільнорадикальних процесів показали, що попереднє застосування  $\omega$ -3 ПНЖК призводить до зменшення всіх кінетичних показників індукованої ХЛ у гомогенатах тканин міокарда з модифіко-

ваними мембранами після стресу порівняно з такими у контрольних стресованих тварин (III група). Аналізуючи зміни показників ХЛ при стресі у щурів з попереднім введенням  $\omega$ -3 ПНЖК відносно тільки стресованих, необхідно відмітити зменшення загальної світлосуми за 5 хв на 33,5 % ( $P < 0,05$ ) (рис. 3), зниження амплітуди швидкого спалаху на 14,9 % і кінцевого значення інтенсивності випромінювання ХЛ через 5 хв на 44,9 % ( $P < 0,05$ ) (рис. 4). Цілком можливо, що сумарна інтенсивність ХЛ знижувалася внаслідок інгібування прооксидантних механізмів активації ПОЛ. Оскільки на характер кінетики ХЛ впливає співвідношення компонентів, які беруть участь у окисному процесі, то на підставі цих результатів можна говорити про пригнічення вільнорадикальних процесів і підсилення антиоксидантних властивостей тканин міокарда. Відомо, що ПОЛ призводить до порушення структурної організації мембран, зміни конформації білків, зміни плинності та проникності клітинних мембран, функцій

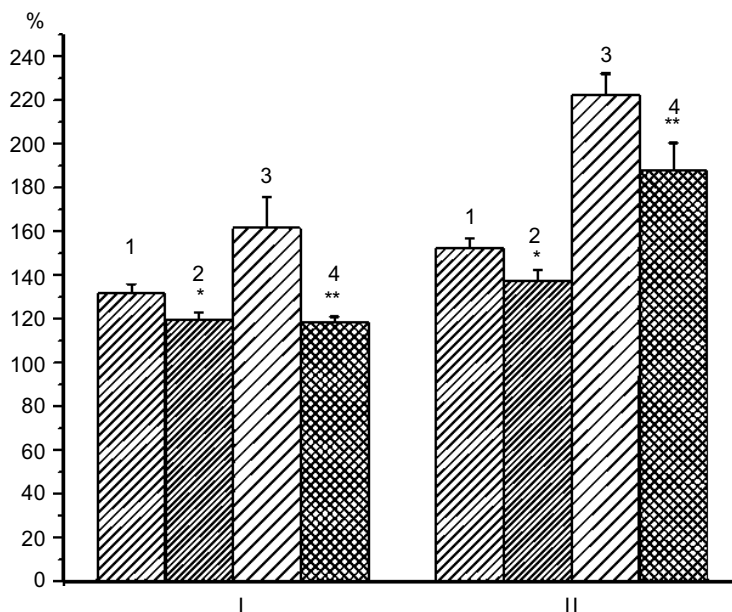


Рис. 2. Вплив  $\omega$ -3 ПНЖК на скорочувальну функцію ізольованого серця щура при дії норадреналіну: I –  $10^{-7}$  моль/л, II –  $10^{-6}$  моль/л. За віссю абсцис – логарифм діючої концентрації норадреналіну; за віссю ординат – систолічний тиск у латексному балоні, введеному в влівий шлуночок серця у відсотках від вихідного рівня (100 %); 1 – контроль, 2 – введення  $\omega$ -3 ПНЖК, 3 – стрес, 4 – стрес при попередньому введенні  $\omega$ -3 ПНЖК.

Тут і на рис. 3, 4 \* вірогідно порівняно з контролем, \*\* вірогідно порівняно зі стресом ( $P < 0,05$ )

іонних каналів, насосів і рецепторів. На основі експериментальних і клінічних досліджень [4, 9] встановлена можливість інгібуючого впливу  $\omega$ -3 ПНЖК на індукцію вільних радикалів, а також їх позитивна дія на антиоксидантні механізми. Водночас, інші дослідники вважають, що споживання  $\omega$ -3 ПНЖК призводить до посилення вільнорадикальних процесів, оскільки ненасичені жирні кислоти є головним субстратом окиснення при ініціації вільнорадикальних реакцій [5, 16]. Враховуючи, що стрес супроводжується стимуляцією утворення активних форм кисню, отримані нами результати свідчать про гальмівний вплив  $\omega$ -3 ПНЖК на інтенсивність вільнорадикальних реакцій при стресі. Це на нашу думку, може бути пов'язано зі зменшенням вмісту АК, як одного з головних субстратів окиснення [1, 13]. У попередній роботі [1] нами також було доведено, що споживання  $\omega$ -3 ПНЖК не лише знижує співвідношення  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ПНЖК, зменшуючи вміст АК, а й пригнічує утворення її похідних – лейкотриєнів і тромбоксанів, синтез яких супроводжується утворенням вільних радикалів. Також показано, що заміна у мембранах клітин АК на ПНЖК із сімейства  $\omega$ -3 викликає зменшення вмісту вторинних продуктів ПОЛ, зокрема малонового діальдегіду,

та посилює активність ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази та каталази) при ішемії міокарда, що додатково свідчить про обмеження утворення вільних радикалів і процесів ПОЛ. Таким чином, можна стверджувати, що модифікація жирнокислотного складу клітинних мембран позитивно вплинула на їх стійкість до перекисних процесів за умов гострого іммобілізаційного стресу.

## ВИСНОВКИ

1. Модифікація жирнокислотного складу фосfolіпідів клітинних мембран міокарда з заміщенням  $\omega$ -6 ПНЖК, зокрема АК, на  $\omega$ -3 ПНЖК (ЕПК і ДГК) значною мірою попереджає ураження серця при іммобілізаційному стресі.

2. Ультраструктурні дослідження свідчать про значне зменшення підвищеної при стресі проникності саркоплазматичних мембран кардіоміоцитів, а також про зменшення пошкодження мітохондрій у тварин з модифікованими мембранами.

3. Захисними механізмами дії  $\omega$ -3 ПНЖК можуть бути гальмування прооксидантних (у числі і інших) процесів і зниження адренергічної реактивності серця у тварин з модифікованими клітинними мембранами.

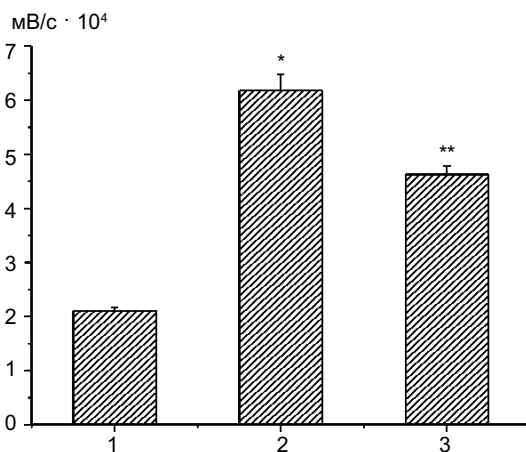


Рис. 3. Вплив  $\omega$ -3 ПНЖК на загальну світлосуму хемілюмінесценції гомогенатів тканин серця щурів: 1 – контроль, 2 – стрес, 3 – стрес при попередньому введенні  $\omega$ -3 ПНЖК

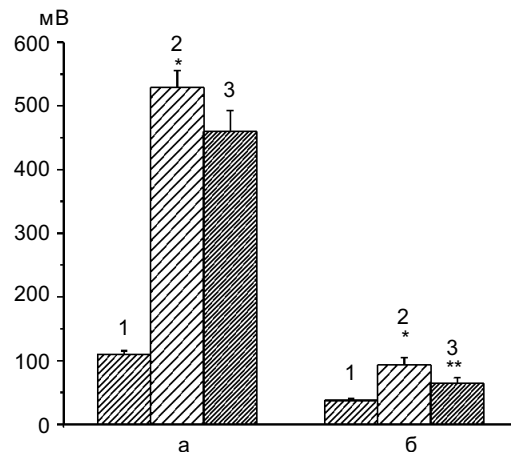


Рис. 4. Вплив  $\omega$ -3 ПНЖК на амплітуду швидкого спалаху (а) та інтенсивність випромінювання хемілюмінесценції через 5хв (б) гомогенатів тканини серця щурів: 1 – контроль, 2 – стрес, 3 – стрес при попередньому введенні  $\omega$ -3 ПНЖК

**A.M. Shysh, T.V. Kukoba, L.V. Tumanovs'ka,  
O.O. Moybenko**

**CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF PHOSPHOLIPID MEMBRANE MODIFICATION ON MYOCARDIUM DURING STRESS INJURY**

In experiments on the isolated rat hearts we investigated the influence of phospholipid membrane modification by omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on the heart reactivity to adrenergic influences, myocardial ultrastructure and peroxidation processes under the immobilization stress. It was shown that omega-3 PUFAs reduced ultrastructural changes in the heart, limited lipid peroxidation and attenuated inotropic response of the heart to exogenous norepinephrine.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Кукоба Т.В., Кириленко О.Є., Шиш А.М., Мойбенко О.О. та ін. Вплив модифікації жирнокислотного складу мембран фосфоліпідів на функціональний стан ізольованого серця при гострій ішемії – реперфузії міокарда // *Фізіол. журн.* – 2003. – **49**, № 5. – С. 51–59.
2. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М., 1984.
3. Непомнящих Л.М. Структурная реорганизация миокарда при экстремальных воздействиях // *Морфология.* – 1997. – 6. – С. 18-24.
4. Погожева А.В., Мартынова Е.И., Самсонов Т.А. и др. Влияние диеты с полиненасыщенными жирными кислотами на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у больных с ишемической болезнью сердца, гиперлипотеидемией и гипертонической болезнью // *Вопр. питания.* – 1994. – № 4. – С. 40–42.
5. Сазонтова Т.Г., Фу С.Т., Белкина Л.М. и др. Влияние диеты, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами, на систему транспорта  $Ca^{2+}$  в саркоплазматическом ретикулуле миокарда // *Бюл. эксперим.*

Биологии и медицины. – 1993. – **116**, № 10. – С. 350–352.

6. Шаров В.Г. Возможные механизмы гибели кардиомиоцитов // *Архив патологии.* – 1985. – **47**, № 3. – С. 3–13.
7. Chin J.P. Marine oils and cardiovascular reactivity // *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids.* – 1994. – **50**. – P. 211–222.
8. Delarue J., Matzinger O., Binnert C. et al. Fish oil prevents the adrenal activation elicited by mental stress in healthy men // *Diab. Metab.* – 2003. – **29**. – P. 289–295.
9. Frenoux J.M., Prost E.D., Belleville J.L., Prost J.L. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats // *J. Nutr.* – 2001. – **131**, № 1. – P. 39–45.
10. Grynberg A., Fournier A., Sergiel J. P., Athias P. Effect of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the phospholipids of rat heart muscle cells on adrenoreceptor responsiveness and mechanism // *J. Mol. Cell. Cardiology.* – 1995. – **27**. – P. 2507–2520.
11. Hallag H., Stith T. W., Leaf A. Modulation of dihydropyridine-sensitive calcium channels in heart cells by fish oil fatty acids // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – **89**. – P. 1760–1764.
12. Hamazaki T, Sawazaki S, Nagasawa T. Administration of docosahexaenoic acid influences behavior and plasma catecholamine levels at times of psychological stress // *Lipids.* – 1999. – **34**. – S. 33–37.
13. Holub B.J. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care // *Can. Med. Assoc. J.* – 2002. – **166**, № 5. – P. 608–615.
14. Mori T. A., Lawrence J. B., Burke V. et al. Interactions between dietary fat, fish, fish oils and their effects on platelet function in men at risk of cardiovascular disease // *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* – 1997. – **17**. – P. 279–286.
15. Nair S.D., Leitch J.W., Falconer J. et al. Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action // *J. Nutr.* – 1997. – **127**, № 3. – P. 383–393.
16. Song J.H., Miyazawa T. Enhanced level of n-3 fatty acid in membrane phospholipids induces lipid peroxidation in rats fed dietary docosahexaenoic acid oil // *Atherosclerosis* – 2001. – **155**, № 1. – P. 9–18.

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

*Матеріал надійшов до  
редакції 05.11.2005*