

Н.О. Дорофєєва, Ю.В. Гошовська, В.Ф. Сагач

Мембранний потенціал мітохондрій серця і швидкість споживання кисню у щурів із генетично детермінованою артеріальною гіпертензією

У дослідженнях на щурах з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією і лінії Вістар (контроль) оцінювали ефективність функціонування мітохондрій серця за допомогою зіставлення рівня мембранного потенціалу, дихання та окисного фосфорилування. Вимірювання мембранного потенціалу і швидкості споживання кисню в суспензії мітохондрій серця здійснювали за допомогою ТРМР⁺-селективного електрода за методом, описаним М. Brand. Процеси мітохондріального дихання і окисного фосфорилування досліджували за допомогою приладу «Оксиграф». Виявлено, що у щурів зі спонтанною гіпертензією мембранний потенціал мітохондрій серця становив $-113,76 \text{ мВ} \pm 3,65 \text{ мВ}$ і був достовірно нижчим, ніж у контрольних тварин ($-152,85 \text{ мВ} \pm 13,52 \text{ мВ}$, $P < 0,01$), тоді як показники швидкості споживання кисню в стані відносного спокою V_2 і V_3 були достовірно збільшені ($P < 0,001$). При одночасному зниженні (на 23,9 %; $P < 0,05$) дихального контролю, який відображає ступінь спряження процесів дихання і фосфорилування. Отримані результати вказують на більш напружену роботу дихального ланцюга з пониженою енергетичною функцією мітохондрій серця тварин з гіпертензією. Зроблено висновок про функціональний зв'язок між особливостями мітохондріального енергозабезпечення і артеріальною гіпертензією.

Ключові слова: мітохондрії, гіпертонія, мембранний потенціал.

ВСТУП

Нині артеріальна гіпертензія є найбільш розповсюдженим захворюванням серцево-судинної системи. В Україні на цю патологію страждає понад третина дорослого населення [7, 12]. Артеріальна гіпертензія є чинником ризику багатьох важких серцево-судинних захворювань і у сукупності з розвиненими ускладненнями – головна причина смертності людей [12]. Проте до теперішнього часу механізм розвитку цього захворювання остаточно не з'ясований. Деякі автори пов'язують причину виникнення артеріальної гіпертензії з клітинно-тканинним дефіцитом енергії, який зумовлений порушенням процесу її перетворення в мітохондріях клітин і скороченням продукції АТФ [1–3, 9, 10]. Вста-

новлено, що у щурів із генетично детермінованою артеріальною гіпертензією знижена АТФ-синтезувальна здатність мітохондрій печінки та головного мозку [1, 3]. Автори припускають, що ці процеси можуть бути пов'язані з особливостями функціонування мембран мітохондрій [1, 3, 9, 10]. Як відомо, основними показниками ефективності функціонування мітохондрій є їх мембранний потенціал, процеси дихання і окисного фосфорилування. Однак у тварин зі спонтанною гіпертензією вони вивчені недостатньо.

Мета нашої роботи – оцінити ефективність функціонування мітохондрій серця щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією за допомогою зіставлення рівня мембранного потенціалу, дихання і окисного фосфорилування.

© Н.О. Дорофєєва, Ю.В. Гошовська, В.Ф. Сагач

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 36 білих щурах-самцях масою 250–300 г, які знаходилися на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Тварин було поділено на дві групи по 18 щурів у кожній. До контрольної групи ввійшли щури лінії Вістар, до дослідної – з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією. Експерименти проводили з дотриманням умов роботи з лабораторними тваринами. Мітохондрії серця щурів виділяли диференціальним центрифугуванням [5]. Ізольовані серця промивали охолодженим 0,9%-м розчином KCl, подрібнювали і гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСl – 25, ЕДТА – 1; рН 7,2–7,4. Гомогенат центрифугували при 700g 8 хв (4°C), а супернатант – повторно при 11000g 16 хв (4°C). Отриманий осад (мітохондріальна фракція) суспендували в буфері (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-НСl – 25; рН (7,2–7,4). Вміст білка в суспензії мітохондрій визначали методом Лоурі [17].

Вимірювання мембранного потенціалу мітохондрій здійснювали за методом, описаним Brand і співавт. [14, 18], який передбачає використання ліполітичного катіона - метилтрифенілфосфоніум броміду (TRMP⁺ від англ. triphenyl-methylphosphonium bromide) і чутливого до нього електрода (TRMP⁺-електрод). Установка для вимірювання мембранного потенціалу в суспензії мітохондрій була створена на базі відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Вона складається з термостатованої (37°C) камери об'ємом 1 мл, TRMP⁺-селективного і референтного електродів, а також електрода Кларка, який дає змогу одночасно реєструвати рівень споживання кисню в суспензії мітохондрій (рис. 1). Сигнал з електродів передається через потенціометр „Sartorius” (Німеччина) і газоаналізатор BMS 3 Mk 2 (Данія) на плату

АЦП L-card і реєструється на персональному комп'ютері за допомогою програмного забезпечення, розробленого у відділі. Мітохондрії інкубували в середовищі, що містить 120 ммоль/л KCl, 25 ммоль/л тріс-НСl, 3 ммоль/л КН₂РО₄, 5 % знежиреного бичачого сироваткового альбуміну; рН (7,2–7,4). У герметичну термостатовану камеру (37°C) з TRMP⁺-селективним електродом вносили мітохондрії з розрахунку 0,5 мг/мл білка. Для ініціації дихання і генерації мітохондріями мембранного потенціалу додавали в камеру 10 мкл сукцинату натрію (5 ммоль/л). Мембранний потенціал мітохондрій ($\Delta\psi$) розраховували за рівнянням Нернста:

$$\Delta\psi = (RT/zF) \ln (a_{\text{out}} / a_{\text{in}}),$$

де R – універсальна газова константа, T – абсолютна температура, z – валентність і F – константа Фарадея, a_{out} і a_{in} – активність жиророзчинних іонів усередині організму і в середовищі інкубації.

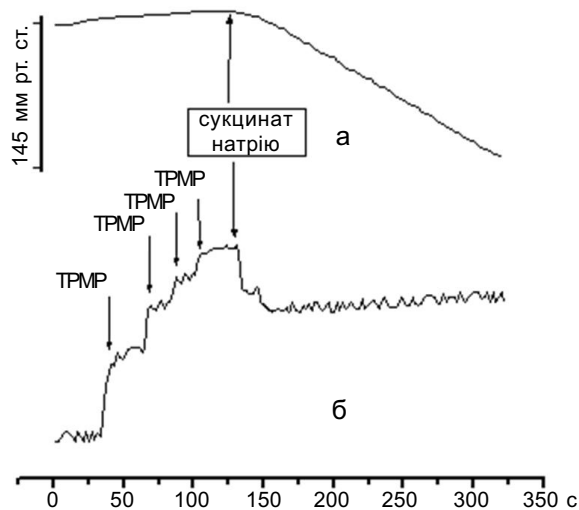


Рис. 1. Одночасна реєстрація мембранного потенціалу і швидкості споживання кисню в суспензії мітохондрій: а – полярографічна крива (зниження її свідчить про поглинання кисню суспензією мітохондрій); б – реєстрація даних з TRMP⁺-чутливого електрода («падіння» свідчить про напрацювання мембранного потенціалу у відповідь на введення субстрату – сукцинату натрію)

Процеси мітохондріального дихання та окисного фосфорилування досліджували полярографічним методом з використанням закритого електрода Кларка за допомогою прилада "Oxygraph" («Hansatech instruments», Великобританія). Функціональний стан мітохондрій визначали методом Чанса та Вільямса [15]. Як субстрат окиснення використовували 20 мкл сукцинату натрію (5 ммоль/л). Дихання стимулювали додаванням 200 мкмоль/л АДФ.

При дослідженні функціонального стану комплексів дихального ланцюга ізольованих мітохондрій серця розраховували наступні параметри: V_2 – швидкість дихання мітохондрій у стані відносного спокою; в стані 2 за Чансом, за наявності субстрату окиснення сукцинату натрію та відсутності акцептора фосфату (АДФ); V_3 – швидкість фосфорилувального дихання мітохондрій (у метаболічному стані 3 за Чансом, при високому вмісті в середовищі інкубації субстрату сукцинату натрію, та за наявності АДФ); V_4 – швидкість контрольованого дихання мітохондрій (у метаболічному стані 4 за Чансом, коли закінчується АДФ, при високому вмісті в середовищі інкубації субстрату сукцинату натрію); дихальний контроль за Чансом – відношення V_3 до V_4 ; АДФ/О – коефіцієнт ефективності фосфорилування.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel 2003. Достовірність показників розраховували за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами виявлено, що мембранний потенціал мітохондрій у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією був достовірно зниженим (рис. 2).

У суспензії мітохондрій серця щурів зі спонтанною гіпертензією значення мембранного потенціалу мітохондрій становило $-113,76 \text{ мВ} \pm 3,65 \text{ мВ}$, а у контрольній групі – $-152,85 \text{ мВ} \pm 13,52 \text{ мВ}$ ($P < 0,01$). Враховуючи, що у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією мембранний потенціал мітохондрій зменшений, можна припустити що саме це може зумовлювати зниження АТФ-синтезувальної їх здатності.

Оскільки дихальний ланцюг взаємопов'язаний з мембранним потенціалом мітохондрій [16] одночасно ми досліджували їх дихання. Виявлено, що у щурів зі спонтанною гіпертензією швидкість споживання кисню в суспензії мітохондрій серця була на 60,0 % вищою (рис. 3), ніж в контрольній групі ($P < 0,05$).

Крім того, оцінювали швидкість споживання кисню в різних функціональних станах мітохондрій за Чансом. Показано, що у щурів зі спонтанною гіпертензією швидкість споживання кисню у стані відносного спокою V_2 була на 62,3 % вищою, ніж у контрольній групі ($P < 0,001$). Також у них було достовірно збільшене значення АДФ-стимульованого дихання V_3 ($P < 0,05$). Це вказує на інтенсифікацію процесів фосфорилування, однак збільшення даного показника не супроводжувалося підвищенням ефективності фосфо-

Показники дихання мітохондрій серця щурів зі спонтанною гіпертензією та щурів контрольної групи в різних функціональних станах мітохондрій (нмоль $\text{O}_2 \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка)

Показники	Контрольна група	Щури зі спонтанною гіпертензією
V_2	$42,83 \pm 2,72$	$69,5 \pm 6,16^{**}$
V_3	$87,4 \pm 6,01$	$117,2 \pm 12,3^*$
V_4	$20,14 \pm 2,92$	$30,5 \pm 2,29^*$
Дихальний контроль за Чансом (V_3/V_4)	$4,57 \pm 0,34$	$3,48 \pm 0,44^*$
АДФ/О	$1,79 \pm 0,10$	$1,68 \pm 0,20$

* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$

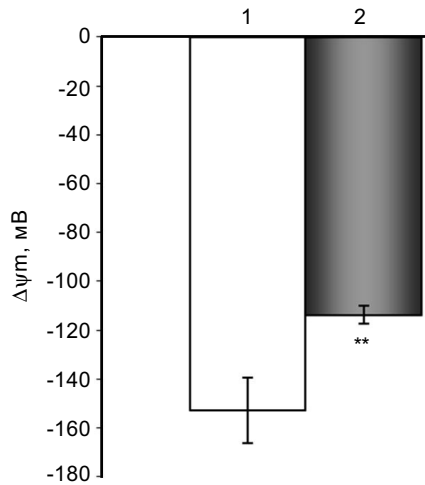


Рис. 2. Значення мембранного потенціалу мітохондрій у суспензії мітохондрій серця: 1 – контрольна група; 2 – щури з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією. **P<0,01

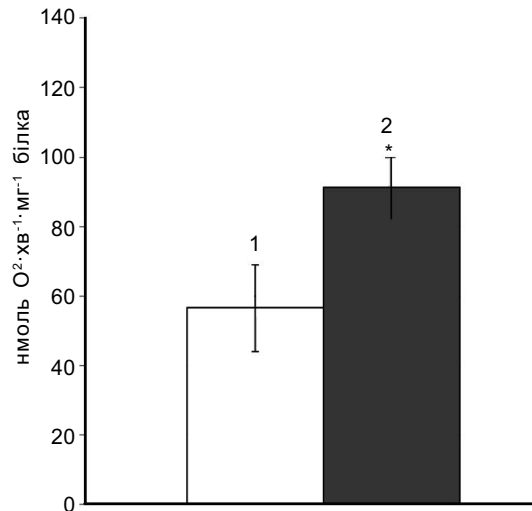


Рис. 3. Швидкість споживання кисню в суспензії мітохондрій серця: 1 – контрольна група; 2 – щури з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією. *P<0,05

рилювання (АДФ/О). У щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією знизився на 23,9 % дихальний контроль (P<0,05), який відображає ступінь спряження процесів дихання і фосфорилування.

Отримані результати вказують на збільшення інтенсивності процесів окиснення і фосфорилування при зниженні спряження цих процесів у мітохондріях серця тварин зі спонтанною гіпертензією. Нативні криві

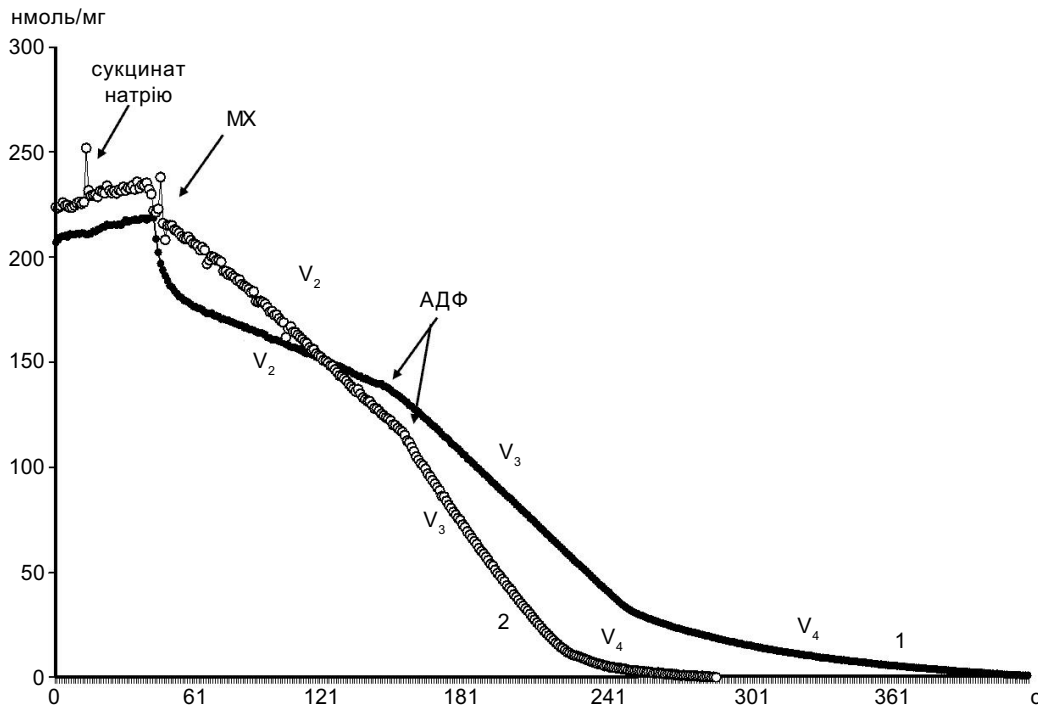


Рис. 4. Нативні криві споживання кисню у контрольних щурів (1) і щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією (2)

споживання кисню у контрольних та щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією показані на рис.4.

Відомо, що мембранний потенціал мітохондрій ($\Delta\psi_m$) створюється електрохімічним градієнтом протонів по обидва боки мембрани і відіграє важливу роль у функціонуванні клітин. Він формує головний компонент електрохімічного потенціалу. Різниця електрохімічних потенціалів протонів ($\Delta\mu_H^+$) є рушійною силою для роботи АТФ-синтази, оскільки електродифузійне перенесення протонів з навколишнього середовища в матрикс необхідне для обертання каталітичної субодиниці F1, і таким чином синтезується АТФ, забезпечуючи адекватне енергозабезпечення органів. За наявності субстратів і кисню в дихальному ланцюзі мітохондрій відбувається перенесення електронів, яке в точках спряження супроводжується витоком протонів через мембрану (один електрон - один протон) з матриксу в зовнішнє середовище. Цієї енергії (≈ 220 мВ) досить для синтезу АТФ з АДФ і ортофосфату.

Зниження значення мембранного потенціалу мітохондрій, що ми зареєстрували у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією, може свідчити про пригнічення у них синтезу АТФ.

Це підтверджується даними літератури. В експериментальних роботах у щурів зі спонтанною гіпертензією встановлена тенденція до зниження вмісту АТФ при збільшенні АМФ, зменшенні відношення АТФ/АДФ і зниженні енергетичного заряду в тканинах серця, печінки, селезінки [8]. Крім того, дані клінічних досліджень показують зменшення вмісту АТФ в еритроцитах хворих з артеріальною гіпертензією [4, 19], а також креатинфосфату і відношення АТФ/Фн у біоптаті тканин скелетних м'язів [21].

Серце є органом дуже чутливим до енергодефіциту. Тому можна припустити, що мітохондрії у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією ви-

мушені працювати з більшим напруженням для забезпечення адекватного функціонування серця. Це підтверджує виявлене нами підвищення швидкості споживання кисню у стані V_3 у щурів зі спонтанною гіпертензією. Проте таке енергозабезпечення є менш ефективним, особливо при значних навантаженнях і стресі. При стресі відбувається інтенсифікація швидкості споживання кисню мітохондріями, «гіперактивация» окиснення сукцинату натрію значно знижує роль НАД-залежних субстратів у загальному метаболічному окисненні [11]. Згідно з даними Лук'янової [6] вплив екстремальних чинників призводить до стану біоенергетичної гіпоксії. Nicholls [19] встановив, що при збільшенні швидкості споживання кисню мітохондріями менше часу електрони затримуються в критичних ділянках, в яких можливий витік протонів, необхідний для обертання каталітичної субодиниці F1 АТФ-синтази і синтезу АТФ. Нами визначено, що вихідні значення показників функціонального стану мітохондрій серця істотно відрізняються у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією і щурів контрольної групи. Достовірне зниження мембранного потенціалу мітохондрій, може пояснювати зменшення синтезу АТФ у щурів зі спонтанною гіпертензією. Про що свідчить зниження спряження процесів окиснення і фосфорилування в мітохондріях серця цих тварин.

ВИСНОВКИ

Нами виявлені особливості функціонування мітохондрій серця у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією, які впливають на енергозабезпечення діяльності серця. Зокрема, виявлено зниження мембранного потенціалу мітохондрій, збільшення швидкості споживання кисню, підвищення показників V_2 і V_3 , при зниженні дихального контролю, який відображає ступінь спряження процесів окиснення і фосфорилування.

**Н. О. Дорофєєва, Ю. В. Гошовська,
В.Ф. Сагач**

**МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ МІТОХОНДРІЙ
СЕРЦЯ І ШВИДКІСТЬ СПОЖИВАННЯ
КИСНЮ У ЩУРІВ З ГЕНЕТИЧНО
ДЕТЕРМІНОВАНОЮ АРТЕРІАЛЬНОЮ
ГІПЕРТЕНЗІЄЮ**

В исследованиях на крысах с генетически детерминированной артериальной гипертензией и линии Вистар (контроль) оценивали эффективность функционирования митохондрий сердца посредством сопоставления уровня мембранного потенциала, дыхания и окислительного фосфорилирования. Измерения мембранного потенциала и скорости потребления кислорода в суспензии митохондрий сердца осуществляли с помощью ТРМР⁺-селективного электрода, а также прибора "Оксиграф". Выявлено, что у крыс с генетически детерминированной артериальной гипертензией мембранный потенциал митохондрий сердца составлял $-113,76 \text{ мВ} \pm 3,65 \text{ мВ}$ и был достоверно ниже, чем у контрольных животных ($-152,85 \text{ мВ} \pm 13,52 \text{ мВ}$, $P < 0,01$), тогда как скорости потребления кислорода в состоянии относительного покоя V_2 , активного состояния органелл V_3 были достоверно увеличены ($P < 0,001$). При этом у них отмечалось снижение дыхательного контроля (на 23,9 %; $P < 0,05$), отражающего степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования. Полученные результаты указывают на более напряженную работу дыхательной цепи митохондрий со сниженной энергообразующей функцией митохондрий сердца животных с генетически детерминированной артериальной гипертензией. Сделан вывод о функциональной связи между особенностями митохондриального энергообеспечения и артериальной гипертензией. Ключевые слова: митохондрии, гипертония, мембранный потенциал.

N. Dorofeyeva, Yu. Goshovska, V.F. Sagach

THE MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL AND OXYGEN CONSUMPTION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

We investigated the mitochondrial membrane potential and processes of respiration and oxidative phosphorylation in suspension of cardiac mitochondria from 6 month old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar (as a control) male rats. The mitochondrial membrane potential and the speed of oxygen consumption were measured using the method described by M.Brand (1995). Processes of respiration and oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria were measured using Oxygraph (Hansatech instruments, Norfolk, England). It has been found that in SHR the mitochondrial membrane potential was lower ($-113,76 \text{ mV} \pm 3,65 \text{ mV}$) compared to Wistar rats ($\Delta\psi_m = -152,85 \text{ mV} \pm 13,52 \text{ mV}$, $p < 0,01$). In SHR, the respiration rate in state V_2 by Chance and V_3 were in-

creased compared to Wistar rats ($p < 0,001$). The respiration control by Chance was depressed by 23,9% in SHR compared to Wistar rats. Our data demonstrate, that SHR have some features of functioning of cardiac mitochondria which distinguish them from the Wistar rats. Our data suggest a functional link between mitochondrial energy supply and arterial hypertension.

Key words: mitochondria, hypertension, membrane potential.

O.O.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Будников Е.Ю., Постнов А.Ю., Дорошук А.Д., Афанасьева Г.В., Постнов Ю.В. Сниженная АТФ-синтезирующая способность митохондрий печени спонтанно гипертензивных крыс (SHR): роль кальциевой перегрузки митохондрий // Кардиология. – 2002. – № 12. – С. 47–50.
2. Гогін С.Є. Синдром артеріальної гіпертонії як ознака дезадаптаційних порушень // Клін. медицина. – 2002. – № 11. – С. 4–9.
3. Дорошук А.Д., Постнов А.Ю., Афанасьева Г.В., Будников Е.Ю., Постнов Ю.В. Сниженная АТФ-синтезирующая способность митохондрий клеток головного мозга крыс со спонтанной гипертензией (SHR) // Кардиология. – 2004. – № 3. – С. 64–65.
4. Емелина Л.П. Некоторые фосфорно-энергетические показатели крови у больных гипертонической болезнью // Врач. дело. – 1972. – №8. – С. 10–13.
5. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Курский М.Д. Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия // Биохимия. – 1985. – 50, №8. – С. 1350–1361.
6. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // БЭБиМ. – 1997. – 124, №9. – С.244–254.
7. Нагорная Н.В., Пшеничная Е.В., Бордюгова Е.В. Артериальная гипертензия у детей. Современные подходы к диагностике, лечению, профилактике // Тавр. мед.-биол. вестн. – 2009. – 12, №2 (46). – С.105–111.
8. Писаренко О.И., Студнева И.М., Постнов А.Ю. Особенности энергетического состояния тканей при спонтанной гипертензии крыс // Кардиология. – 1998. – 12, №37. – С. 37–40.
9. Постнов Ю.В. К развитию мембранной концепции патогенеза первичной гипертензии: нарушенная функция митохондрий и энергетический дефицит // Там же. – 2000. – № 10. – С. 4–12.
10. Постнов Ю.В., Орлов С.Н., Будников Е.Ю., Дорошук А.Д., Постнов А.Ю. Нарушение преобразования энергии в митохондриях клеток с уменьшением синтеза АТФ как причина стационарного повышения уровня системного артериального давления // Там же. – 2008. – № 8. – С. 49–59.

11. Ткаченко Г.М., Кургалюк Н. М. Вплив активатора K_{ATP} -каналів – пінацидину на функціонування мітохондрій печінки щурів із різною резистентністю до гіпоксії за стресу // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, №1. – С. 56–64.
12. Фоміна И.Г., Дьякова Т.А. Гипертрофия левого шлуночка при артериальной гипертензии и риск развития аритмий // Кардиовас. терапия и профилактика. – 2006. – №5(8). – С. 83.
13. Чернобривенко А.А. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента и артериальная гипертензия // Новости медицины и фармации. – 2005. – № 16. – С.13–14.
14. Brand M.D. Measurement of mitochondrial proton-motive force. Bioenergetics: A Practical Approach, IRL Press, Oxford. – 1995. – P. 39–62.
15. Chance B., Williams G. The respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation // Adv. Enzymol. – 1956. – **17**. – P. 65–134.
16. Duchon Michael R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology // Mol. Aspects Med. – 2004. – **25**. – P. 365–451.
17. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with the Folling phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, № 1. – P. 265–275.
18. Nadtochiy S.M., Tompkins A., Brookes P.S. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and precondition: implications for pathology ancardioprotection // Biochem J. – 2006. – **395**. – P. 611–618.
19. Nicholls D.G. Mitochondrial membrane potential and aging // Aging Cell. – 2004. – № 3. – P. 35–40.
20. Resnick L.M., Gupta R.K., Barbagallo M., Laragh J.H. Is the higher incidence of ischemic disease in patients with hypertension and diabetes related to intracellular depletion of high energy metabolites? // Amer. J. Med. Sci. – 1994. – **307**: Suppl 1. – P. 66–69.
21. Ronquist G., Soussi D., Frithz G. Disturbed energy balance in skeletal muscle of patients with untreated primary hypertension // J. Intern. Med. – 1995. – **238**. – P.167–174.

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

*Матеріал надійшов до
редакції 24.01.2011*