

А.В. Дмитрієва, В.Ф. Сагач, А.Ю. Богуславський

Дослідження участі мітохондріальної пори в розвитку порушень скорочувальної активності міокарда та судин

В експериментах на изолированных миокардиальных и сосудистых препаратах была исследована роль митохондриальной поры (МП) транзитной проницаемости в развитии реперфузионных повреждений миокарда и сосудов. Суперфузия предварительно активированных миокардиальной трабекулы (МТ) и артериальной полоски (АП) солевым раствором, который был собран в течение первых 5 мин реперфузии изолированного ишемизированного сердца, вызывала резкое и значительное падение тонического напряжения миокардиального и сосудистого препаратов. Кроме того, зарегистрировано значительное угнетение сократительных ответов МТ и АП на тестовую электрическую стимуляцию, а также модулирующего влияния препарата-донора на сократительные реакции препарата-реципиента. Совокупность наших результатов и данных, полученных в дополнительных экспериментах на изолированных митохондриях, позволили утверждать, что в оттекающем от ишемизированного сердца растворе присутствует митохондриальный стабильный фактор (МСФ), обладающий выраженным дилататорным действием. Добавление в реперфузионный раствор метиленового синего и диэтилмалеата нивелировало его дилататорное влияние. Суперфузия (10 мин) поврежденных МТ и АП раствором нитрозоглутамата (10^{-5} моль/л) восстанавливала нормальные сократительные реакции изолированных препаратов и модулирующее влияние препарата-донора на реакции препарата-реципиента, что еще раз подтверждает наличие в составе МСФ NO-содержащего соединения. Таким образом, активация МП играет ведущую роль в развитии реперфузионных повреждений миокарда и приводит к высвобождению МСФ, который может быть основным агентом паракринной регуляции сократительной активности миокарда, тонуса коронарных и периферических сосудов.

ВСТУП

Проблема ішемії–реперфузії міокарда досить добре описана в літературі. Відома достатня кількість біологічно активних речовин і метаболітів, що беруть участь у розвитку зворотних і незворотних порушень діяльності серця [5, 13]. Проте і нині суперечними лишаються погляди як на шляхи розвитку, так і на медіаторну природу постішемічних дисфункцій. Відомості про участь супероксидних радикалів в ушкодженні міокарда під час ішемії–реперфузії з'явилися досить давно [10], але місце і спо-

сіб їхнього утворення остаточно не з'ясовано. Наприкінці 90-х років увагу дослідників цієї проблеми привернули мітохондрії в зв'язку з зареєстрованими транзитними змінами проникності їхньої мембрани [8, 9]. У мембрані мітохондрій знайшли структуру, що одержала назву мітохондріальної пори (МП) транзитної проникності, яка була здатна до активації і відкриття під впливом різних факторів, у тому числі ішемії, аноксії та гіпоксії [8, 9, 15, 16]. Більшу частину дослідів з активацією та інгібіцією МП було проведено на ізольованих мітохондриях або кардіоміоцитах, а вплив модуляторів

© А.В.Дмитрієва, В.Ф.Сагач, А.Ю. Богуславський

відкриття МП на працююче серце і серцево-судинну систему і досі залишається майже невивченим. Тому нашою метою стало дослідити вплив активації та інгібіції МП на скорочувальну функцію міокарда та судин і роль МП у розвитку дилататорних реакцій периферичних судин.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на ізольованих міокардіальних трабекулах з вушка правого передсердя та кільцевих смужках із сонної артерії морських свинок масою 350–450 г. Тварин декапітували, швидко проводили торакотомію, відтинали вушко правого передсердя і сегменти загальної сонної артерії. Відпрепаровані тканини переносили в охолоджений розчин наступного складу (ммоль/л): NaCl – 118, KCl – 4,7, MgSO₄ – 1,2, NaHCO₃ – 24, KH₂PO₄ – 1,2, глюкоза – 10, CaCl₂ – 2,5. З вушка правого передсердя виділяли тонкі трабекули, що склалися з односпрямованих м'язових волокон. Сегменти сонної артерії нарізали на кільця товщиною 1,5–2 мм відповідно до напрямку м'язових волокон. Міокардіальні та судинні препарати переносили в термостатовану, двокамерну установку, що давала можливість як послідовної, так і ізольованої перфузії досліджуваних препаратів розчином того самого складу [1]. У дослідах використовували синхронну та послідовну електричну стимуляцію ізольованих препаратів з такими параметрами: 5 Гц, 50 мс, 30 В, 30–31°C.

Ішемію–реперфузію серця моделювали за допомогою повної зупинки перфузії ізольованого за Лангендорфом серця на 20 хв і наступної реперфузії протягом 40 хв. Перфузійний розчин, що відтікав з легеневої артерії, збирали за перші 5 хв реперфузії і перфузували ним міокардіальну трабекулу та судинні смужки. Оксидативний стрес для міокарда моделювали за допомогою інкубації міокардіальної трабекули в розчині активатора МП феніларсиноксиду (ФАО, 10⁻⁵ моль/л) протягом 2–3 хв [12], після

чого розчин видаляли, камеру додатково промивали контрольним розчином і відновлювали послідовну перфузію. Судинна смужка під час інкубації трабекули з ФАО ізольовано перфузувалася контрольним сольовим розчином. Реєстрували тонічне напруження як міокардіальної трабекули (МТ), так і послідовно перфузованої артеріальної смужки (АС), що давало змогу оцінити вплив відтікаючого від пошкодженої трабекули перфузійного розчину на АС. Статистичну обробку даних проводили різницевим методом і за допомогою критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після попередньої активації ізольованих препаратів МТ і АС за допомогою електричної стимуляції, послідовна 2-хвилинна перфузія препаратів розчином, який збирали за перші 5 хв реперфузії ішемізованого ізольованого серця, викликала значне зменшення тонічного напруження як МТ, так і АС на $2,36 \pm 0,3$ і $2,24 \text{ мН} \pm 0,32 \text{ мН}$ відповідно ($n=10$, $P<0,05$; рис. 1). У тих випадках, коли ішемія викликала глибоку та незворотну депресію міокарда ізольованого серця, перфузія розчином, зібраним за перші 5 хв його реперфузії, викликала більш глибоку депресію скорочувальної активності МТ і АС, яка не відновлювалася протягом 20 хв відмивання контрольним розчином. Тривала 10-хвилинна перфузія ізольованих препаратів відтікаючим від ішемізованого серця розчином ще більше пригнічувала тонічне напруження міокардіального та судинного препаратів на $3,38 \pm 0,37$ і $3,1 \text{ мН} \pm 0,28 \text{ мН}$ відповідно ($n=10$, $P<0,05$; див. рис. 1). Після такої перфузії різко пригнічувалися скорочувальні реакції препаратів у відповідь на тестову послідовну електричну стимуляцію. МТ підвищувала тонічне напруження тільки на $0,5 \pm 0,07$, а АС – на $0,87 \text{ мН} \pm 0,09 \text{ мН}$, у той час як у контролі скорочувальна відповідь становила $3,52 \pm 0,67$ і $1,11 \text{ мН} \pm 0,13 \text{ мН}$

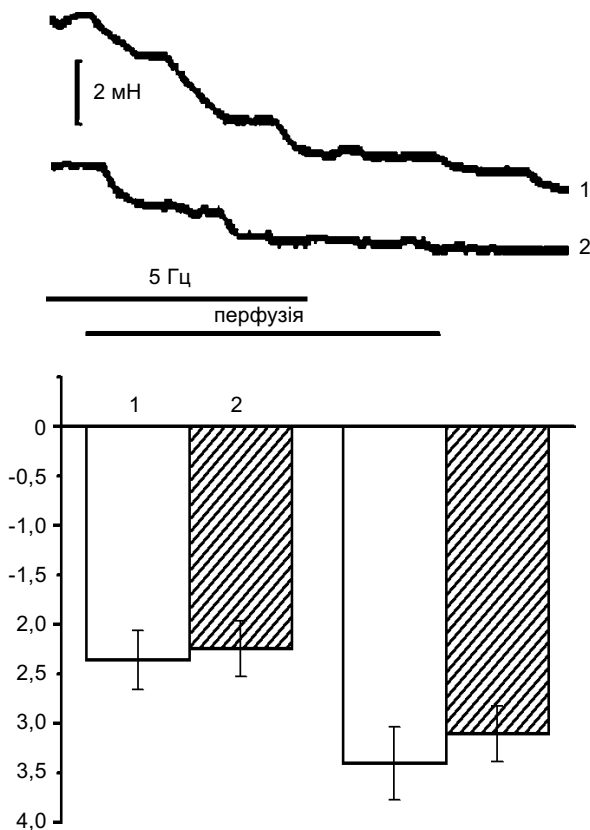


Рис. 1. Вплив розчину, зібраного під час реперфузії ізолюваного серця, на тонічне напруження міокардіальної трабекули (1) і артеріальної смужки (2). Зверху нативний запис

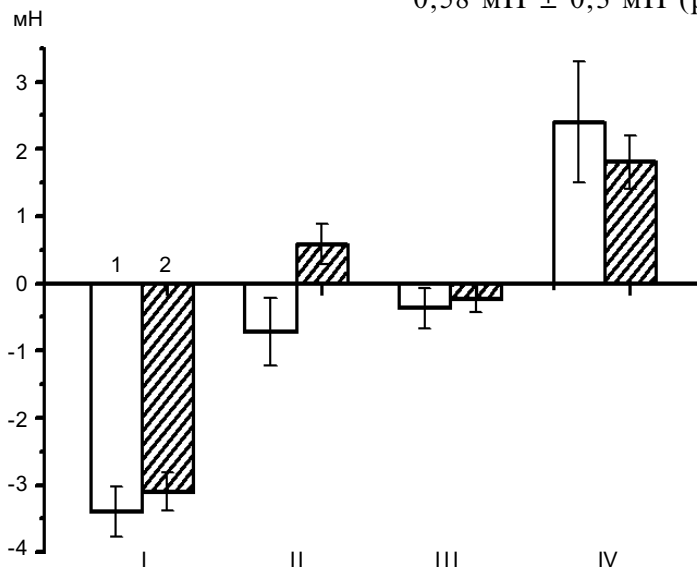


Рис. 2. Вплив метиленового синього, дитіотриетиолу та діетилмалеату на зміни тонічного напруження міокардіальної трабекули (1) і артеріальної смужки (2) під дією розчину, зібраного під час реперфузії ішемізованого серця: I – перфузія, II – дія метиленового синього; III – дія дитіотриетиолу, IV – дія діетилмалеату

відповідно ($n=10$, $P<0,001$). Потужна негативна інотропна та дилататорна дія відтікаючого від ішемізованого серця розчину не знижувалася при його нагріванні і збереженні впродовж однієї доби при кімнатній температурі. Таким чином, з пошкодженого міокарда вивільнюється стабільний фактор, який має потужний дилататорний ефект [3, 4]. Спектрофотометричне дослідження відтікаючого від серця розчину та додаткові досліди на ізольованих мітохондріях виявили наявність у цих розчинах мітохондріального стабільного фактора, концентрація якого тісно корелювала зі ступенем пригнічення функції серця [2, 4].

Відомо, що деякі біологічно активні речовини і перед усім NO, здійснюють дилататорну дію через активацію розчинної гуанілатциклази [1]. Тому ми перевірили чи не є виявлений нами стабільний депресорний фактор такою NO-вмісною сполукою. Перфузія попередньо оброблених метиленовим синім (10^{-4} моль/л) ізольованих препаратів розчином, зібраним за перші 5 хв реперфузії, викликала лише незначне зниження тонічного напруження МТ на $0,72 \text{ мН} \pm 0,5 \text{ мН}$, у той час як АС скорочувалася на $0,58 \text{ мН} \pm 0,3 \text{ мН}$ (рис. 2), що вірогідно

відрізнялося від контрольних умов. Послаблення дилататорного впливу мітохондріального стабільного фактора під дією інгібітора розчинної гуанілатциклази метиленового синього може свідчити про те, що в складі фактора може бути NO-вмісний компонент, швидше за все нітрозотіольна сполука [11]. Для перевірки цього ми вирішили використати модифікатор тіолових груп дитіотриетол (ДТТ, $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Перфузія ізольованих препаратів відтікаючим від ішемізованого серця розчином з додаванням ДТТ різко послаблювала його дилататорний вплив – МТ розслаблювалася тільки на $0,4 \pm 0,3$, а АС на $0,23 \text{ мН} \pm 0,3 \text{ мН}$ (див. рис. 2), що вірогідно менше ($n=8$, $P<0,001$) впливу відтікаючого розчину в контролі. У наступній серії експериментів додавання у відтікаючий від ішемізованого серця розчин скавенджера глутатіону діетилмалеату (ДЕМ, $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л) призводило до інверсії реакції ізольованих препаратів – МТ підвищувала тонічне напруження на $2,41 \pm 0,9$, а АС – на $1,8 \text{ мН} \pm 0,4 \text{ мН}$ ($n=8$, $P<0,001$). Більш того, зібраний під час перших хвилин реперфузії розчин з додаванням ДЕМ не пригнічував скорочувальні відповіді препаратів на послідовну електричну стимуляцію – вони були близькі до контрольних. Отримані результати свідчать, що в складі неідентифікованого мітохондріального стабільного фактора є NO-вмісні структури, можливо, нітрозоглутатіон [14, 17, 18].

Для порівняння змін скорочувальної активності міокарда та судинних препаратів під впливом відтікаючого від ішемізованого серця розчину та за умов прямої активації МП, ми використовували ФАО. Міокардіальну трабекулу преінкубували в розчині з ФАО впродовж 2 хв. Її реперфузія призводила до глибокого зниження тонічного напруження обох препаратів на $8,7 \pm 2$ і $5,92 \text{ мН} \pm 0,89 \text{ мН}$ відповідно ($n=10$, $P<0,001$; рис. 3). Зареєстрована реакція була якісно подібна до впливу розчину, відтікаючого від ішемізованого серця (див.

рис. 1), але зниження, викликане дією ФАО, перевищувало амплітуду зниження тонічного напруження препаратів під впливом реперфузійного розчину. Посилення депресорних реакцій у цій серії дослідів пояснюється, на нашу думку, прямим впливом ушкоджуючого фактора на МТ, пошкодженням мітохондрій і вивільненням більшої кількості нітрозотіольних з'єднань [7, 11]. Пригнічення реакцій на електричну стимуляцію ізольованих суперфузованих препаратів після дії активатора МП на МТ було подібним до зареєстрованих за умов перфузії ізольованих препаратів розчином, який відтікав від ішемізованого серця. Тонічне напруження ушкодженої МТ збільшувалося лише на $0,13 \text{ мН} \pm 0,19 \text{ мН}$ ($n=10$, $P<0,001$),

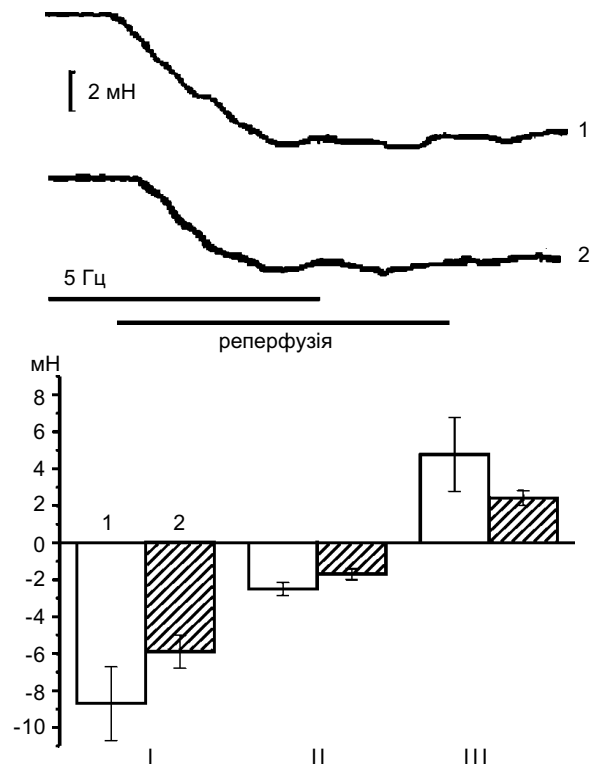


Рис. 3. Вплив реперфузії міокардіальної трабекули, преінкубованої з феніларсиноксидом, на тонічне напруження міокардіальної трабекули (1) і артеріальної смужки (2). Зміни впливу реперфузії за умов дії: I – феніларсиноксиду, II – феніларсиноксиду та метиленового синього, III – феніларсиноксиду та діетилмалеату. Зверху нативний запис

а АС скорочувалася на $2,33 \text{ мН} \pm 0,58 \text{ мН}$ (рис. 4). Отже, ми одержали модель, котра легко відтворює ушкодження міокарда, яке спричиняє активація МП, і реакцію на це периферичних судин під час реперфузії пошкодженого міокарда. Отримані результати свідчать про якісну подібність процесів, що відбуваються. Додатковим підтвердженням було визначення мітохондріального стабільного фактора, який вивільнюється із міокарда за умов його перфузії розчином з ФАО [4].

Послідовна 10-хвилинна перфузія пошкоджених препаратів з нітрозоглутатином (10^{-5} моль/л) повністю відновлювала скорочувальні реакції МТ і АС на електричну стимуляцію. При цьому тонічне напруження МТ збільшувалося на $3,76 \pm 0,4$, а АС – на $2,3 \text{ мН} \pm 0,15 \text{ мН}$, що вірогідно відрізняється від реакцій, зареєстрованих у попередній серії дослідів. Слід особливо відзначити відновлення модулюючого впливу розчину, який відтікає від МТ, на скорочувальну реакцію АС (див. рис. 4). Така реакція реєструється тільки за умов нормального функціонального стану ендотеліальних клітин [1]. Додавання в перфузійний розчин

ДЕМ перед реперфузією інкубованої з ФАО трабекули, як і в разі перфузії препаратів розчином, відтікаючим від ішемізованого серця з додаванням ДЕМ, призводило не до зменшення тонічного напруження ізольованих препаратів у процесі реперфузії, а до її підвищення у МТ на $4,77 \pm 1$ і на $2,42 \text{ мН} \pm 0,4 \text{ мН}$ у АС ($n=8$, $P<0,001$; див. рис. 3). Реакція ізольованих препаратів на електричну стимуляцію за цих умов не відрізнялася від контрольної (див. рис. 4). В останній серії експериментів ми використали реперфузію інкубованої з ФАО трабекули з інгібітором розчинної гуанілатциклази метиленовим синім (10^{-4} моль/л). Така модифікація реперфузії інкубованої з ФАО МТ вірогідно більше ніж у 3 рази зменшувала розслаблюючі реакції МТ і АС (див. рис. 3), що було знову ж таки подібним до реакцій, зареєстрованих за умов перфузії ізольованих препаратів відтікаючим від ішемізованого серця розчином. Отримані результати свідчать про мітохондріальне походження виявленого дилататорного мітохондріального стабільного фактора і наявності в його структурі NO-вмісного компонента [18].

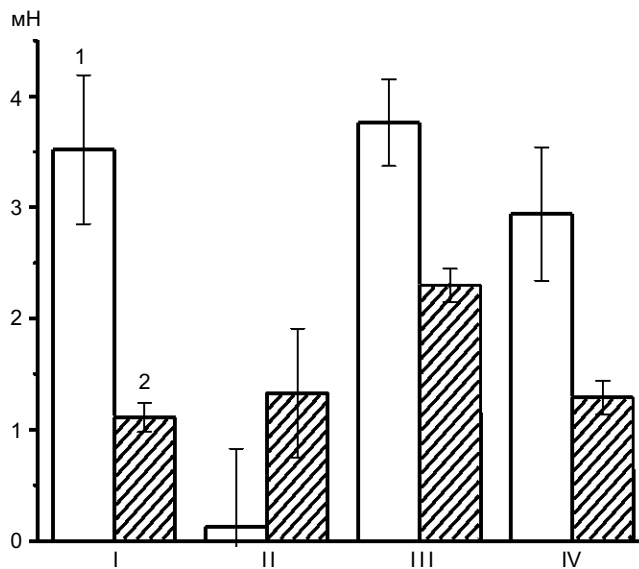


Рис. 4. Скорочувальні реакції міокардальної трабекули (1) та артеріальної смужки (2) на електричну стимуляцію за умов впливу: I – контрольний розчин, II – феніларсиноксид, III – феніларсиноксид і нітрозоглутатіон, IV – феніларсиноксид і діетилмалеат

Таким чином, оксидативний стрес мітохондріального походження бере активну участь у розвитку порушень скорочувальної функції міокарда за умов ішемії–реперфузії, що збігається з даними, отриманими іншими авторами [6, 9, 15, 16]. Мітохондрії і потім ушкоджена оксидативним стресом сарколема можуть бути основними джерелами нітрозотіольних сполук, можливо нітрозоглутатіону [14], який здатний бути основним діючим чинником мітохондріального стабільного фактора. Наведені дані свідчать, що стабільний фактор, який вивільнюється із міокарда під час ішемії–реперфузії, може здійснювати паракринну регуляцію не тільки скорочувальної активності серця, гладеньких м'язів коронарних судин, але і гуморально зумовлені зміни тону периферичних судин [17] відповідно зі ступенем ушкодження міокарда. Крім того, отримані результати вказують на можливість використання нітрозотіольних сполук як протекторів оксидативних пошкоджень міокарда, але це потребує додаткових досліджень.

A.V. Dmitrieva, V.F. Sagach, A. Yu. Boguslavsky

THE INVESTIGATION OF MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE (MPTP) IN THE DEVELOPMENT OF MYOCARDIAL AND VASCULAR CONTRACTILITY DISFUNCTIONS

In experiments on the isolated myocardial and vascular preparations the role of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) in the development of reperfusion injury was investigated. Co-perfusion of the previously activated myocardial trabecula (MT) and arterial rings (AR) by solution collected during the first 5 min of isolated heart reperfusion, caused a sharp and significant decrease of tonic tension of both isolated preparations. Besides the significant inhibition of the MT and AR reactions after electrical stimulation, modulation of AR reaction by the influence of MT is also registered. The solution collected at first minutes of heart reperfusion, preserve a dilation property within 24 hours of storage at room temperature. Preliminary perfusion of MT and AR with methylen blue (MB, 10^{-4} M/l) or the addition to the solution dithiothreitol (DTT, $2 \cdot 10^{-5}$ M/l) and diethyl maleate (DEM, $2 \cdot 10^{-5}$ M/l) resulted in an almost complete inhibition of this dilatation influence on the isolated preparations. The data

received testify that the solution comprise a NO-containing substance, possible nitrosoglutation. Pre-incubation (2 min) MT in a solution with mPTP activator phenylarsine oxide (PAO, 10^{-5} M/l) and subsequent reperfusion with a control solution resulted in deep and irreversible decrease of tonic tension and inhibition of contractility of both isolated preparations. The received data are qualitatively similar to results described above. Our data and results received in additional experiments on isolated mitochondria allow us to assert that solution flowing from the ischemized heart contains the stable mitochondrial factor (SMF) with a significant dilatation property. An addition of MB and DEM in the reperfusion solution abrogated its dilation influence. Co-perfusion (10 min) of the injured MT and AR by the solution with nitrosoglutation (10^{-5} M/l) restored normal contractility of the isolated preparations and modulation of the AR reaction by the influence of MT. It once again confirms the presence of an NO-containing substance in the SMF content. Thus, the mPTP activation plays the key role in the development of myocardial reperfusion injury and results in release of SMF, which can be the basic agent of paracrine regulation of myocardial contractility, coronary and peripheral vessels tone.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Жукова А. В. Модулюючий вплив ендотеліального релаксуючого фактора на реактивність міокарда та артеріальних судинних смужок // *Фізіол. журн.* – 1999. – **45**, № 1–2. – С. 64–72.
2. Сагач В.Ф., Вавілова Г.Л., Струтинська Н.А., Акопова 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., 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 // Там само. – 2002. – **48**, №1. – С. 3–8.
4. 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. 7–13.
5. Bolli R., Bhatti Z.A., Tang X.L., Qiu Y.M. Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits triggered by the generation of nitric oxide // *Circulat.Res.* – 1997. – **81**, № 1. – P.42–52.
6. Borutaite V., Jekabsone A., Morkuniene R., Brown G.C. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevent mitochondrial dysfunction, cytochrom c release and apoptosis inuced by heart ischemia // *J.Mol. Cell.Cardiol.* – 2003. – **35**.–P. 357–366.

7. Borutaite V., Morkuniene R., Brown G.C. Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms // FEBS Lett. – 2000. – **467**. – P. 155–159.
8. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // Biochem. J. – 1999. – **341**. – P. 233–249.
9. Crompton M., Andreeva L. On the involvement of a mitochondrial pore in reperfusion injury // Bas. Res. Cardiol. – 1993. – **88**. – P. 513–523.
10. Flaherty J., Weisfeldt M. Reperfusion injury // Free Radic. Biol. And Med. – 1988. – 5, №5–6. – P. 409–419.
11. Jekabsone A., Dapkunas Z., Brown G.C., Borutaite V. S-Nitrosothiol-induced rapid cytochrom c release, caspase activation and mitochondrial permeability transition in perfused heart // Biochem. Pharmacol. – 2003. – **66**. – P. 1513–1519.
12. Korge P., Goldhaber J.I., Weiss J.N. Phenylarsine oxide induced mitochondrial permeability transition, hypercontracture, and cardiac cell death // Amer. J. Physiol. – 2001. – **280**. – P. H2203–H2213.
13. Lefer A.M. Significance of lipid mediators in shock states // Circulat. Shock. – 1989. – **27**. – P. 3–12.
14. Mayer B., Pfeiffer S., Schrammel A. et al. A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**, №6. – P. 3264–3270.
15. Murphy A. Mitochondria in human disease // The Biochemist. – 2000. – **4**. – P. 29–34.
16. Sastre J., Pallardo F.V., Vina J. Mitochondrial oxidative stress play a key role in aging and apoptosis // Life. – 2000. – **49**. – P. 427–435.
17. Stamler J.S., Jaraki O., Osborn J. et al. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin // Proc. Natl. Acad USA. – 1992. – **89**. – 7674–7677.
18. Stefan M., Sarkela T.M., Gubina A.A. et al. Methabolism of nitrosoglutathione in intact mitochondria // Biochem. J. – 2001. – **356**. – P. 395–402.

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

*Матеріал надійшов
до редакції 16.02.2005*