УДК 616.379-008.64:576.311.347 + 577.334

А.М. ШИШ, А.С. ЖУКОВСЬКА, О.О. МОЙБЕНКО

ОМЕГА-3 ПНЖК МОДУЛЮЮТЬ ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ І ПОПЕРЕДЖУЮТЬ НАБУХАННЯ МІТОХОНДРІЙ СЕРЦЯ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦД

В работе показано, что применение ω-3 ПНЖК ведет к уменьшению содержания в ткани миокарда малонового диальдегида, а также оказывает благоприятное влияние на состояние ферментов антиоксидантной защиты - супероксиддисмутазы и каталазы в условиях сахарного диабета. Доказана способность ω-3 ПНЖК предупреждать набухание митохондрий в сердце при экспериментальном сахарном диабете.

***Ключевые слова**: омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, сердце, митохондрии, малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза и каталаза.*

***

Згідно з сучасними уявленнями перекисні процеси, що відбуваються у ліпідних структурах клітинних мембран, сприяють порушенню їх цілісності, призводячи до незворотних пошкоджень. Порушення цілісності або функцій клітинних мембран відіграють важливу роль у патогенезі серцево-судинних захворювань, а процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) є одним з універсальних механізмів пошкодження за умов будь-якої патології [2,3]. Активація оксидативного стресу призводить до відкриття мітохондріальної пори, наслідком чого є набухання мітохондрій. На сучасному етапі багатьма дослідниками оксидативний стрес розглядається як ключовий момент у патогенезі розвитку пізніх ускладнень цукрового діабету (ЦД) [6]. При цьому вважається, що гіперглікемія супроводжується посиленням генерації вільних радикалів унаслідок автоокиснення глюкози, що може призвести до деструктивного окиснення білкової молекули при ЦД. Тому питання про можливість регуляторного впливу на процеси ПОЛ є актуальним.

Проблема ЦД надзвичайно актуальна у світі, а також в Україні. Адже за даними статистики, в українській популяції налічують понад 1 млн 200 тис хворих на ЦД, що обумовлює необхідність пошуку патогенетичних методів лікування цієї недуги. Одним з перспективних напрямків є модифікація жирнокислотного складу клітинних мембран за допомогою ω-3 поліненасичених жирних кислот (ПНЖК). Препарати ω-3 ПНЖК уповільнюють розвиток атеросклерозу, зменшують імовірність розвитку інфаркту міокарда за рахунок гіполіпідемічних, антиагрегантних, протизапальних властивостей, що обумовлено, зокрема, модифікацією жирнокислотного складу клітинних мембран [13,15]. ω-3 ПНЖК вбудовуються в мембрану та зв`язуються з мембранними білками, змінюючи їх функції, активність ферментів і транспортних молекул. Отже, відновлення антиоксидантного захисту при ЦД внаслідок вживання ω-3 ПНЖК може мати позитивний вплив на перебіг ЦД. Однак серед літературних джерел нам не вдалося виявити грунтовних досліджень щодо впливу ω-3 ПНЖК на функціональний стан прооксидантно-антиоксидантної системи (АОС) та функцію мітохондрій при експериментальному ЦД.

Мета: дослідити вплив ω-3 ПНЖК на інтенсивність ПОЛ, активність ферментів антиоксидантної системи та набухання ізольованих з міокарда мітохондрій при експериментальному ЦД.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 140-200 г, віком 3 міс. ЦД моделювали одноразовим введенням стрептозотоцину („Sigma", США). Препарат розводили 0,1-молярним цитратним буфером (рН 4,5) і вводили тваринам внутрішньоочеревинно із розрахунку 50 мг/кг. Розвиток гіперглікемії контролювали за підвищенням вмісту глюкози в крові, який вимірювали за допомогою стандартного набору (глюкометр і тест-смужки Accu-Chek Active, «Roche», Німеччина). Дослідження проводили на тваринах, вміст глюкози яких перевищував 14 ммоль/л. У роботі використовували 3 групи тварин: I – контрольні щури, (n=21), II- щури з ЦД, (n=11), III- щури, яким після підтвердження зростання вмісту глюкози в крові почали давати препарат епадол протягом 4 тиж у дозі 0,1 мг/100 г маси тіла, (n=18). Епадол містить 45% ω-3 ПНЖК тваринного походження (суміш ейкозапентаєнової і докозагексаєнової кислот з риб`ячого жиру). Через 4 тиж після

підтвердження зростання глюкози в крові тварин зважували і декапітували. Після декапітації швидко вилучали серця, вміщували їх у льодяний 0,9%-й розчин KCl до зупинки серця.

Мітохондрії виділяли з серця за методом диференційного центрифугування в середовищі виділення наступного складу (ммоль/л): сахароза – 250, тріс-HCl – 20, EGTA – 1 (pH 7,2-7,4) та 0,5%-го бичачого сироваткового альбуміну. Дослідження набухання мітохондрій проводили методом спектрофотометричної реєстрації. Суспензію мітохондрій поміщали у 1 мл інкубаційного середовища ізотонічного складу (ммоль/л): KCl – 120, тріс-HCl – 25, KH_2PO_4 - 3, сукцинат Na – 5 (pH 7,2-7,4) та за допомогою спектрофотометра реєстрували зниження оптичної густини ізольованих мітохондрій до (за 5 хв) і після (через 10 хв) дії розчину $CaCl_2$ при λ=520 нм [4]. Набухання мітохондрій індукували додаванням $CaCl_2$ (кінцева концентрація 10^{-4} моль/л). Концентрація білка становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора, оптичну густину реєстрували при λ=520 нм протягом 15 хв. Для підтвердження того, що набухання відбулося внаслідок відкривання мітохондріальної пори, пробу перед додаванням індуктора додатково інкубували 5 хв з класичним інгібітором – циклоспорином А 10^{-5} моль/л «Fluka».

Біохімічними методами у плазмі крові тварин визначали вміст продуктів ПОЛ - малонового діальдегіду (МДА) та активність антиоксидантних ферментів - супероксиддисмутази (СОД) та каталази (КАТ) за загальноприйнятими методиками [1,5,7].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані нами дані свідчать про зростання інтенсивності перекисних процесів у плазмі крові тварин за умов розвитку ЦД, що дозволяє припустити існування порушення балансу у системі ПОЛ/АОС, що може призводити до надлишкового накопичення вторинних продуктів ПОЛ. Зареєстровано збільшення продукції МДА у плазмі крові в 3 рази (P<0,05), порівняно з контролем (рис. 1). Виявлено, що застосування за цих же умов ω-3 ПНЖК, супроводжувалося суттєвим вірогідним зменшенням концентрації МДА (у 2,2 рази, P<0,05) у плазмі крові тварин відносно показників у тварин, без застосування ω-3 ПНЖК. Існують дані літератури де зазначається про уповільнення процесів перекисного окиснення ліпідів внаслідок застосування ω-3 ПНЖК [11,14].

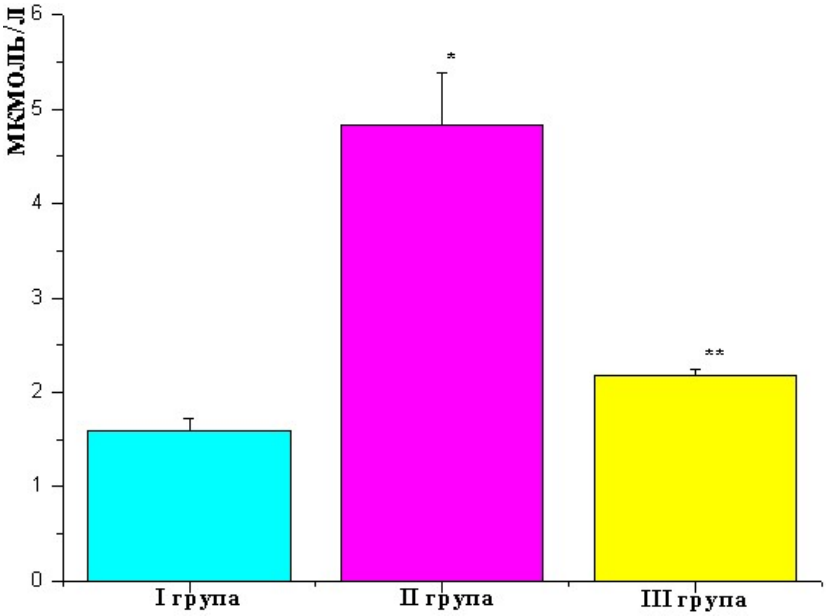


Рис 1. Вміст МДА у плазмі крові щурів.

Примітка

I група – контроль,

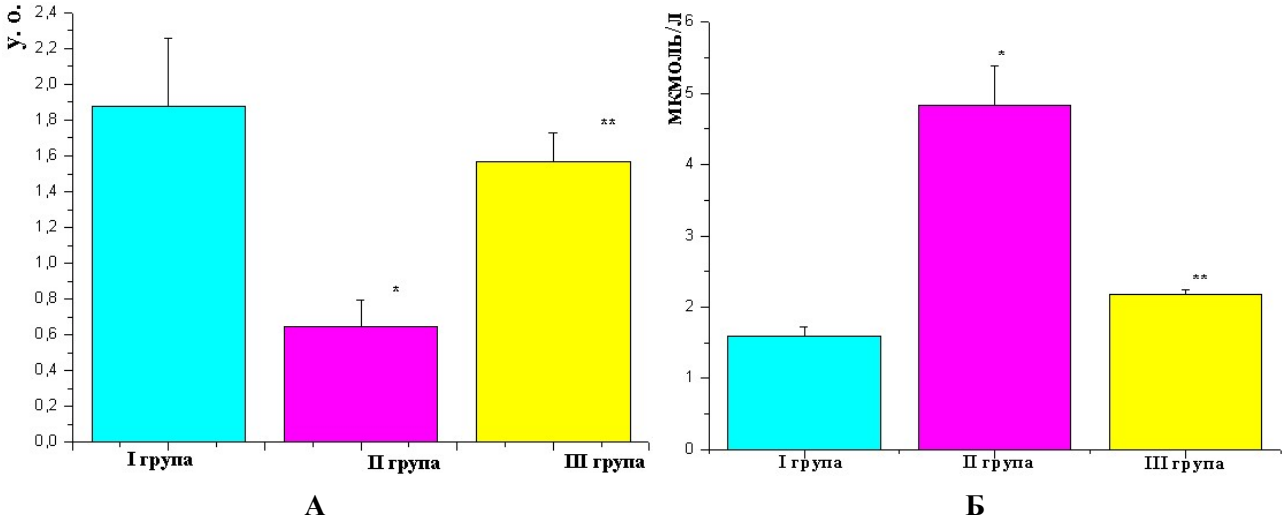
II група – ЦД, * - вірогідно у порівнянні з контролем,

III група – ЦД та ω-3 ПНЖК ** - вірогідно у порівнянні з цукровим діабетом; P<0,05.

Результати проведених нами досліджень показали, що розвиток ЦД призводить до достовірного зниження активності каталази у 2,6 рази (P<0,05) та СОД в 2,9 разів (P<0,05), порівняно з групою контролю (рис. 2 а, б). Застосування ω-3 ПНЖК за умов ЦД відновлює активність СОД та КАТ. Зокрема, активність КАТ і СОД внаслідок модифікації жирнокислотного складу клітинних мембран

зростала в 2,7 (P<0,05) та 2,4 (P<0,05) рази порівняно з групою діабет (рис. 2 **А**, **Б**). Раніше нами було встановлено, що застосування ω-3 ПНЖК призводить до модифікації жирнокислотного складу клітинних мембран, зокрема до зменшення вмісту ω-6 ПНЖК та збільшення вмісту ω-3 ПНЖК в фосфоліпідах клітинних мембран [8]. Зазначимо, що в літературі описані як позитивний вплив ПНЖК через зниження проявів оксидативного стресу [14,18], так і пригнічення активності антиоксидантних ферментів при ЦД [17].

Раніше нами було показано, що одним з кардіопротекторних механізмів ω-3 ПНЖК може бути істотне зменшення пошкоджуючого впливу вільних радикалів, продуктів ПОЛ [8]. Зокрема, було виявлено зменшення продукції вільних радикалів кисню, пригнічення інтенсивності вільнорадикальних реакцій та процесів ПОЛ за умов ішемії-реперфузії. Як і в наших дослідах, в інших роботах було показано, що модифікація жирнокислотного складу клітинних мембран запобігала зниженню активності ферментів антиоксидантного захисту [9,11,19].



А **Б**

Рис. 2. Активність каталази (А) та СОД (Б) у плазмі крові щурів.

Примітка

I група – контроль,

II група – ЦД, * - вірогідно у порівнянні з контролем,

III група – ЦД та ω-3 ПНЖК ** - вірогідно у порівнянні з цукровим діабетом; P<0,05.

Отримані результати свідчать, що застосування ω-3 ПНЖК позитивно впливає на стійкість мембран до перекисних процесів внаслідок посилення ферментативної ланки антиоксидантного захисту та пригнічення процесів ПОЛ.

На підтвердження можливого взаємозв`язку між окисними порушеннями та відкриттям мітохондріальної пори, нами також було досліджено вплив ω-3 ПНЖК на набухання ізольованих мітохондрій серця щурів. На рис. 3 зображено характерні графіки реєстрації набухання мітохондрій з сердець дослідних тварин за контрольних умов, без дії індукторів. Нами показано, що у групі з ЦД підвищується величина набухання мітохондрій як контрольного показника так і кальцій-індукованого на 93,75 (P<0,05) та 11,18% відповідно в порівнянні з контролем (рис. 4). Слід зазначити, що попередня інкубація мітохондрій з циклоспорином А за умов дії Ca^{2+} попереджувала їх набухання. Оскільки набухання мітохондрій є одним з показників відкриття мітохондріальної пори, можемо припустити, що набухання мітохондрій, яке ми спостерігали при ЦД може бути пов`язане з відкриттям мітохондріальної пори.

Обгрунтовуючи наші дані зазначимо, що в міокарді діабетичного серця зростають прояви стресу ендоплазматичного ретикулуму, який призводить до набухання мітохондрій через відкриття мітохондріальної пори. Так, Miki та співавт. було встановлено підвищення експресії маркерів стресу ендоплазматичного ретикулуму – білків GRP78, GRP94 в міокарді щурів з ЦД [16]. У деяких інших сучасних дослідженнях також показано порушення кальцій-опосередкованої проникності мітохондріальної пори в мітохондріях, ізольованих з серця діабетичних тварин [10]. Зниження швидкості споживання кисню мітохондріями, пов`язане з порушенням роботи переносників електронів може бути також наслідком набухання мітохондрій і розриву їх зовнішніх мембран,

внаслідок чого з мітохондрій виходить цитохром с, який є одним з переносників електронів по дихальному ланцюгу.

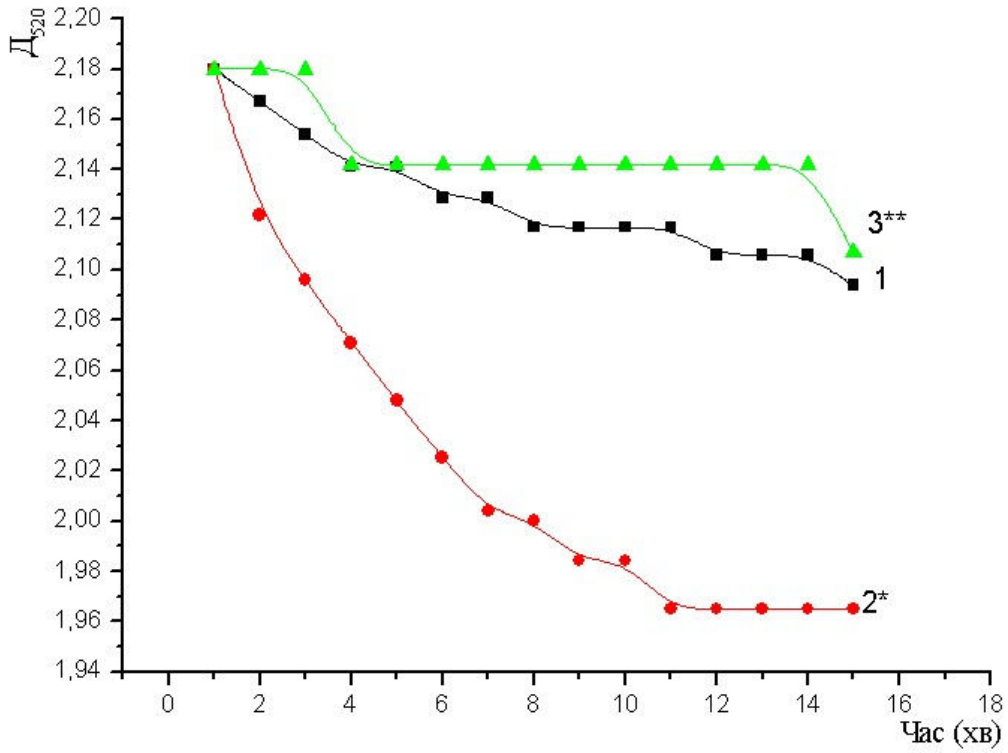


Рис. 3. Часова залежність світлопоглинання мітохондрій, виділених з сердець діабетичних тварин та за умов впливу ω-3 ПНЖК.

Примітка

I група – контроль,

II група – ЦД, * - вірогідно у порівнянні з контролем,

III група – ЦД та ω-3 ПНЖК ** - вірогідно у порівнянні з цукровим діабетом; P<0,05.

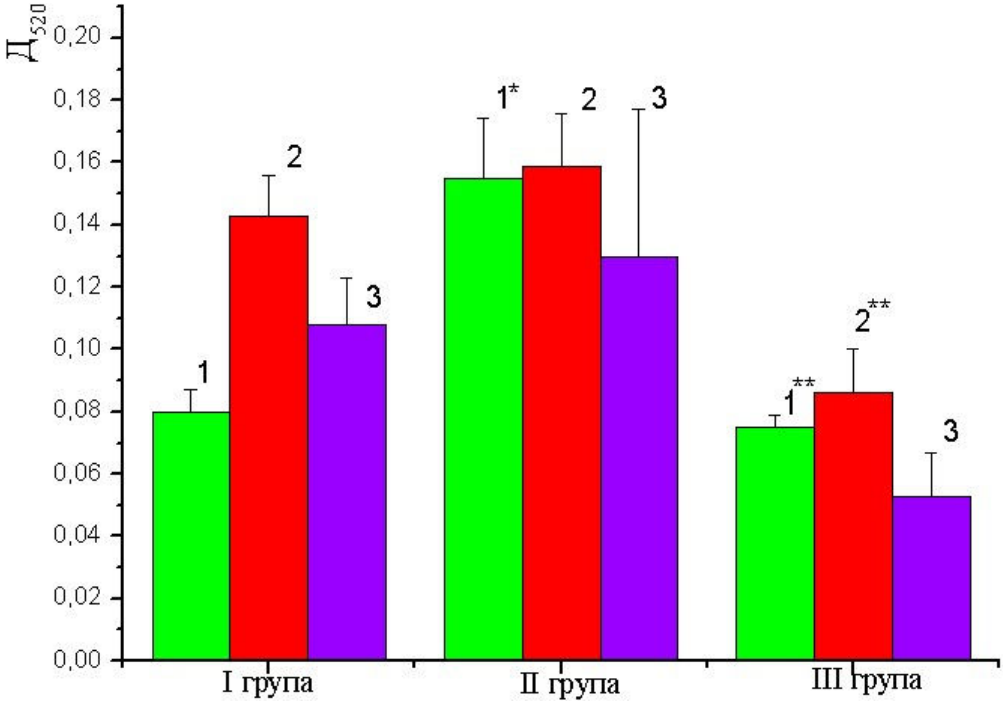


Рис. 4. Вплив ω-3 ПНЖК на зміну світлопоглинання мітохондрій з тканини серця діабетичних щурів за умов дії кальцію.

Примітка

I група – контроль,

II група – ЦД, * - вірогідно у порівнянні з контролем,

III група – ЦД та ω-3 ПНЖК ** - вірогідно у порівнянні з цукровим діабетом; P<0,05.

1- мітохондрії в безкальцієвому середовищі,

2- дія кальцію на мітохондрії, 10^{-4} моль/л,

3 – преінкубація мітохондрій з циклоспорином А, 10^{-5} моль/л;

Зміна жирнокислотного складу клітинних мембран серця (III група) викликала зниження показника контрольного набухання мітохондрій на 51,61% (P<0,05), порівняно з групою ЦД (II група) (рис. 3, 4). Реакція мітохондрій на присутність йонів Ca^{2+} у щурів III групи була на 45,91% (P<0,05) нижчою, у порівнянні з II групою. В експериментах встановлено, що застосування циклоспорину А, класичного інгібітора мітохондріальної пори, знижувало величину оптичної густини ізольованих мітохондрій на 38,37% у тварин III групи, у порівнянні з II групою. Таким чином, отримані дані дозволяють припустити, що ω-3 ПНЖК запобігають відкриттю мітохондріальної пори.

За результатами поодиноких досліджень відомо, що безпосередня інкубація ізольованих мітохондрій з вільними ПНЖК (арахідоновою, докозапентаєновою, ейкозапентаєновою) стимулює набухання та деполяризацію їх мембран, мітохондріальна пора виявились підвищено чутливою до циклоспорину. Автори вказаного дослідження вважають, що вплив ПНЖК може бути частково обумовлений активацією каспазного шляху через вивільнення цитохрому с у поєднанні з деполяризацією мітохондріальної мембрани [12].

В наших експериментах ω-3 ПНЖК виявляли протекторну дію відносно кальцій-індукованого набухання мітохондрій, попередивши набухання мітохондрій. Відомо, що за умов оксидативного стресу різко зростає проникність мітохондріальної мембрани за рахунок зміни властивостей її фосфоліпідів. Внаслідок підвищення проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани, збільшення колоїдно-осмотичного тиску та наступного набухання зовнішня мітохондріальна мембрана може розірватись, що призведе до руйнування органел. Вже показано, що ω-3 ПНЖК мають антиоксидантний та мембраностабілізуючий ефект , що може пояснювати протекторний ефект при індукції набухання. Раніше отримані дані підтверджують, що ці кислоти підвищують стійкість клітинних мембран до пошкоджуючої дії стресорних факторів [9]. Основою цього, на нашу думку, є збереження цілісності клітинних мембран та в значній мірі зменшення руйнування мітохондрій у серці під впливом ω-3 ПНЖК. Спираючись на літературні дані і аналізуючи отримані, можна припустити, що ω-3 ПНЖК попереджують набухання мітохондрій шляхом пригнічення вільнорадикальних процесів і проявів стресу ендоплазматичного ретикулуму в міокарді.

Таким чином, отримані дані дозволяють припустити, що одним із позитивних механізмів ω-3 ПНЖК є здатність попереджувати набухання мітохондрій в серці, пригнічення процесів ПОЛ, посилення ферментативної ланки антиоксидантного захисту та рекомендувати їх для корекції та профілактики дисфункцій мітохондрій за умов різноманітної серцево-судинної патології на фоні ЦД.

ЛІТЕРАТУРА

1. Королюк М. А., Иванова А. И., Майорова И. Т., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело - 1988. - № 1. - С. 16-19.
2. Ланкин В. З., Тихазе А. К., Беленков Ю. Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях. - М.: Наука, 2001. - 78 с.
3. Мхітарян Л. С., Орлова Н. М., Євстратова І. Н., Гуляницька І. П., Дроботько Т. Ф. Характеристика вільнорадикального окислення білків та ліпідів в умовах ішемічної хвороби серця за різних типів порушення ліпідного обміну.// Укр. кард. журнал. – 2002.– № 6. – С. 41-44.
4. Сагач В. Ф., Вавілова Г. Л., Рудик О.В., Струтинська Н. А. Вивільнення неідентифікованих речовин мітохондріального походження – показник відкривання мітохондріальної пори щурів // Фізіол. журн. – 2003. – Т 49, № 5. – С. 3-13.
5. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. В кн.: Совр. Методы в биохимии. Под ред. Ореховича В. Н. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-67.
6. Трахтенберг Ю. А., Аметов А. С., Демидова Т. Ю., Воробьева И. В. Антиоксидантная терапия непролиферативной диабетической ретинопатии // Врач. — 2006. — № 11. — С. 15-18.
7. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело – 1985. - № 11. – С. 678-681.
8. Шиш А. М., Кукоба Т. В., Кириленко О. Є., Мойбенко О. О. Вплив препарату „Епадол" на серцево-судинну систему при гострій ішемії-реперфузії міокарда. // Вісник Вінницького Національного медичного університету – 2007. – Т.11, № 2/1. – С. 496-499.
9. Шиш А. М., Кукоба Т. В., Тумановська Л В., Мойбенко О. О. Модифікація жирнокислотного складу мембран як фактор захисту міокарда при стресорному пошкодженні серця // Фізіол. журн. – 2005. – Т.51, №2. – С. 17-23.
10. Anderson E. J., Rodriguez E., Anderson C. A., Thayne K., Chitwood W. R., Kypson A. P. Increased propensity for cell death in diabetic human heart is mediated by mitochondrial-dependent pathways // Amer. J. Physiol. Heart Circ Physiol. – 2011. – Vol.300, N. 1. – P.118-124.
11. Ando K, Nagata K, Yoshida R, Kikugawa K, Suzuki M. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on lipid peroxidation of rat organs // Lipids. - 2000. - Vol.35, № 4. - P. 401-407.

12. Arita K., Kobuchi H., Utsumi T., Takehara Y., Akiyamad J., Hortone A. A., Utsumi K. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids // Biochem. Pharmacol. – 2001. – Vol. 62 – P. 821–828.
13. De Caterina R., n–3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease // N Engl J Med. – 2011. – Vol.364, N. 24. - P. 39-50.
14. 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. - Vol. 131, № 1. - P. 39-45
15. Hooper L., Thompson R. L., Harrison R. A., Summerbell C. D., Ness A. R., Moore H. J., Worthington H. V., Durrington P. N., Higgins J. P., Capps N. E., Riemersma R. A., Ebrahim S. B., Davey Smith G. Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review // BMJ.-2006.-Vol.332.–P.752-760.
16. Miki T., Miura T., Hotta H., Tanno M., Yano T., Sato T., Terashima Y., Takada A., Ishikawa S., Shimamoto K. Endoplasmic reticulum stress in diabetic hearts abolishes erythropoietin-induced myocardial protection by impairment of phospho–glycogen synthase kinase-3β–mediated suppression of mitochondrial permeability transition // Diabetes. – 2009. – 58. – P.2863–2872.
17. Song J. Y., Fujimoto K., Miyazawa T. Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid–containing oils // J. Nutr. - 2000. - Vol.130. - P. 3028–3033.
18. Suresh Y., Das U. N. Differential effect of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on alloxan-induced diabetes mellitus // Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. – 2006. – Vol.74, N.3. – P. 199-213.
19. Yuan Y. V., Kitts D. D. Dietary (n-3) fat and cholesterol alter tissue antioxidant enzymes and susceptibility to oxidation in SHR and WKY Rats // . J. Nutr. - 2003. - Vol.133. - P. 679–688.

A.M. SHYSH, A.S. ZHUKOVSKA, O.O. MOIBENKO

OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS MODULATE THE FUNCTIONAL STATUS OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM AND PREVENT HEART MITOCHONDRIAL SWELLING IN EXPERIMENTAL DIABETES

This paper shows that application of ω-3 fatty acids leads to a decrease of malondialdehyde content in myocardial tissue, and has beneficial effects on antioxidant enzymes - superoxide dismutase and catalase in diabetes. We proved ability of ω-3 pufa to prevent swelling of heart mitochondria in experimental diabetes mellitus.

Keywords: omega-3 polyunsaturated fatty acids, heart mitochondria, malondialdehyde, superoxide dismutase and catalase.

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,
відділ загальної та молекулярної патофізіології, Київ

Адреса для листування:
Шиш Анжела Михайлівна
Тел. 0442562074
angela@biph.kiev.ua

Дата поступлення: 27.11.2012 р.