

N E W S

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 2, Number 314 (2016), 192 – 196

**VIOLATIONS OF PROTEIN OXIDATION
OF THE MITOCHONDRIAL FRACTION
OF CARDIOMYOCYTES
WITH HYPERTENSION AND DIABETES
IN EXPERIMENTAL ANIMALS**

B. S. Zhumashov, B. T. Tastemirova, A. N. Omarova, S. N. Zhumashov

International Kazakh-Turkish University named by Kh. A. Yesevi, Turkestan, Kazakhstan.
E-mail: Zsaidulla_51@mail.ru

Key words: hypertension, mitochondrion, cardiomyocyte, diabetes.

Abstract. In animals with atherosclerosis there is the highest antioxidant depletion of reserves and it increases progressively in the background of experimental diabetes mellitus and atherosclerosis.

НАРУШЕНИЕ ОКИСЛЕНИЯ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ГИПЕРТОНИИ И САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

С. Н. Жумашов, Б. Т. Тастемирова, Б. С. Жумашов, А. Н. Омарова

Международный казахско-турецкий университет им. Х. А. Ясави, Туркестан, Казахстан

Ключевые слова: гипертония, митохондрия, кардиомиоцит, сахарный диабет.

Аннотация. У животных с атеросклерозом зафиксировано наибольшее истощение антиоксидантных резервов и прогрессивно увеличивается на фоне экспериментального сахарного диабета и атеросклероза.

Введение. Гипертоническая болезнь остается наиболее распространенным заболеванием системы кровообращения, охватывая треть взрослого населения в Республике Казахстан [1].

В последние годы опубликованы экспериментальные работы, в которых показано, что нарушение нормальной регуляции артериального давления происходит на фоне развивающегося энергетического дефицита. В связи с этим большой интерес представляют исследования функционирования митохондрий в условиях артериальной гипертензии (АГ) [2].

Как известно, митохондрии являются ключевыми продуцентами энергии в клетке, образуя аденоинтрифосфат (АТФ) путем окислительного фосфорилирования. Эти органеллы реагируют на любые изменения в интра- и экстрацеллюлярном матриксе и принимают участие в запрограммированной клеточной гибели – апоптозе. Важным регулятором нормального функционирования митохондрий является митохондриальная пора (МП). Она представляет собой высокоселективный потенциалзависимый генный канал внутренней мембранны диаметром 3 нм, способный пропускать молекулы размером менее 1,5 кДа [3].

Ряд исследователей показали, что в митохондриях кардиомиоцитов крыс со спонтанной гипертензией (SHR) выявляются нарушения пространственной организации митохондриального ретикулума, а также отмечается снижение продукции АТФ [4]. Но в клинической практике АГ часто сочетается с сахарным диабетом (СД) и ишемической болезнью сердца (ИБС).

В этой связи исследование функционирования митохондрий при сочетанной кардиоваскулярной патологии представляется перспективным направлением.

Методы исследования. В исследовании использовали нормотензивных белых беспородных крыс-самцов массой 220–270 гр (n=10), а также спонтанно гипертензивных крыс-самцов (SHR) массой 220–300 гр (n=30). Исследования проведены на научно-исследовательской лаборатории кафедры морфологии человека международного казахско-турецкого университета им. Х. А. Ясави (проф. С. Н. Жумашов).

Первая экспериментальная группа состояла из крыс линии SHR (n = 10), которая моделировала сахарный диабет путем однократного внутрибрюшинного введения стрептозоцина в дозе 50мг/кг, разведенного ex tempore в 1 мл 0,1 М цитратного буфера (pH 4,5) после 12 часового голодания. Далее каждое животное размещали в отдельной клетке при свободном доступе к воде и пище. В течение первых суток эксперимента крысы выпаивали 20% раствором глюкозы, в течение вторых суток – 10% раствором глюкозы.

Вторая экспериментальная группа представлена крысами линии (n = 20), которым моделировали атеросклероз путем ежедневных пероральных введений гиперлипидогенной смеси на протяжении 20 суток, состоящей из масляного раствора холестерина в дозе 40 мг/кг и эргокальциферола в дозе 350 000 Ед/кг и твина – 80 в дозе 10 мг/кг (II), третья группа 10 интактных крыс-самцов SHR. В качестве группы контроля использовали нормотензивных беспородных крыс-самцов (n=10).

На 20 день исследования у крыс всех групп измеряли систолическое артериальное давление (АД) методом пletизмографии при помощи прибора («Transonic Systems Jhc», CWA), измерение проводили трижды с усреднением полученных результатов. Уровень АД у нормотензивных крыс составил 126-⁺3 мм рт. ст., а у крыс линии SHR 155 5 мм рт. Ст. (p<0,05).

После этого животных декапитировали под тиопенталовым наркозом (40кг/мг). Материалом для исследования была ткань сердца, из которой выделяли митохондриальную фракцию в 10-кратном объеме среды, содержащей (в ммоль) сахарозы -250, трис-HCl буфера -20 ЭДТА -1 (рН 7,4). Выделение митохондрий проводили методом дифференциального центрифугирования на рефрижераторный центрифуге «Sigma 3-30 к» (Sigma Laborzentrifugen GmbH Германия) при температуре +40 С. Для очистки митохондриальной фракции от крупных клеточных фрагментов, предварительно проводили центрифугирование в течение 7 мин при 100 д., а затем супернатант повторно центрифугировали в течение 20 мин при 1600 д.

В митохондриальной фракции определяли степень окислительной модификации белков (ОМБ) по реакции взаимодействия окисления аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием алдегидфенилгидрогеназы (АФГ), имеющих максимум поглощения при 270 нм и кетонфенил гидразонов (КФГ), имеющих максимум поглощения при 363 нм. Результаты выражали в условных единицах оптической плотности в пересчете на общий белок с учетом коэффициента разведения пробы.

В безбелковом экстракте митохондрий ткани сердца проводили количественное определение содержания адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ) методом тонкослойной хроматографии на пластинках «силифол». После разделения в подвитной фазе, состоящей из диоксана, изопропанола, воды и амиака (в соотношении 4:2:4:1), нуклеотиды идентифицировали в ультрафиолетовом свете (260 нм) по светопогашению элюантов. Результат рассчитывали по калибровочной кривой и выражали в мкмоль на грамм ткани. Определение содержания лактата в митохондриях, выделенных из ткани сердца экспериментальных животных, проводили по методу Хохарста [5].

Для углубленного анализа состояния энергообеспечения миокарда рассчитаны дополнительные фракции адениловых нуклеотидов:

- энергетический заряд (ЭЗ)-АТФ+ 1/2АДФ/АТФ+АДФ+АМФ.
- энергетический потенциал (ЭП) = АТФ/АДФ
- индекс фосфорилирования (ИФ) = АТФ/АДФ+АМФ
- термодинамический контроль дыхания (ТКД) = АДФ/АМФ.

В качестве интегрального маркера системы митохондриальной дисфункции выбран процесс открытия гигантских МП, выделенных из ткани сердца экспериментальных животных.

Для этого фрагмент миокарда крыс тщательно промывали охлажденным 0,9 % раствором KCL (3-4⁰С), измельчали и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды (в ммоль): сахарозы - 250, трис-HCl-буфера -20, ЭДТА -1 (рН 7,4) митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования при температуре 4⁰С.

Сначала гомогенат центрифугировали 7 минут при 700 для осаждения клеточных фрагментов. Затем супернатант центрифугировали повторно 15 минут при 11 000 д.

Полученный осадок митохондрий суспендировали в небольшом объеме среды выделения (но без ЭДТА) и сохраняли во льду при температуре от 0 до +1⁰С.

Для регистрации открытия МП в инкубационную смесь, которая состояла из 120 ммоль KCL, 0,5 ммоль KN₂ PO₄, ммоль глутамата, 1 ммоль малата, 20 ммоль триас -HCL-буфера (рН 7,4), выносили суспензию митохондрий. Изменения барьера функции митохондриальных мембран определяли спектрофотометрическим методом как снижение светопоглощения при 540 нм, вызванное набуханием митохондрий и выходом Ca²⁺, открытие МП сопровождалось набуханием митохондрий и выходом Ca²⁺ во вне митохондриальное пространство после Ca²⁺ перегрузки органелл.

Снижение оптической плотности (ΔE) в исследуемых образцах характеризует интенсивность процесса.

Все спектрофотометрические исследования выполняли на приборе (khriba S32 PC (Bicahrom Ltd Англия).

Статистическую обработку данных производили с помощью пакета программ «Statistica 60», «Statsaft», США № лицензии AXXR712Д833214 FANS). Сравнительный анализ в группах проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием критерия Ньюмана – Кейлса для множественных сравнений. Статистически значимыми считали отличия при < 0.05.

Результаты и их обсуждение. В результате исследований установлено, что окислительная модификация белков (ОМБ) является одним из ранних внутриклеточных индикаторов повреждения функциональных микромолекул [6, 7]. Дисфункция митохондрий, как правило, сопровождается интенсивной генерацией активных форм кислорода (АФК), что ведет к повреждению белков и липидов как самих митохондрий, так и других клеточных компонентов. Анализируя экспериментальные данные, следует отметить, что у SHR крыс существенно (по сравнению с контролем) повышается пероксидантный потенциал митохондрий миокарда (таблица).

Показатели окислительного повреждения белков митохондриальной фракции кардиомиоцитов

Группа животных	Спонтанная ОМБ		Металл-катализированная ОМБ	
	АФГ, е.о.п./г белка*	КФГ, е.о.п./г белка	АФГ, е.о.п./г белка	КФГ, е.о.п./г белка
SHR+СД ¹	28,849 ± 1,035	25,547 ± 0,706	20,312 ± 1,244	16,789 ± 0,895
SHR+атеросклероз ²	26,49 ± 1,78	19,774 ± 0,614	34,821 ± 2,802	19,769 ± 0,624
SHR ³	22,844 ± 2,337	17,577 ± 2,115	29,819 ± 3,008	16,898 ± 1,288
Контроль	6,863 ± 0,4	5,511 ± 0,53	10,266 ± 0,847	6,288 ± 0,588
	$P_{1-2} > 0,05$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{1-4} < 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$ $P_{3-4} < 0,05$	$P_{1-2} < 0,05$ $P_{1-3} < 0,05$ $P_{1-4} < 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$ $P_{3-4} < 0,05$	$P_{1-2} < 0,05$ $P_{1-3} < 0,05$ $P_{1-4} < 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$ $P_{3-4} < 0,05$	$P_{1-2} > 0,05$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{1-4} < 0,05$ $P_{2-3} > 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$ $P_{3-4} < 0,05$

* – е.о.п./г – единиц оптической плотности грамм; ¹SHR+СД – спонтанная гипертензия + сахарный диабет; ²SHR + атеросклероз – спонтанная гипертензия + атеросклероз; ³SHR – спонтанная гипертензия нормотензивные крысы.

Содержание продуктов спонтанной окислительной модификации митохондриальных белков АФГ и КФГ достоверно выше во всех экспериментальных группах по сравнению с контролем. При этом в группе крыс SHR с сахарным диабетом регистрируется статистически с нормотензивным животным, но и у крыс SHR с атеросклерозом и без него в то же время, повышение маркеров метал-комбилизированной ОМБ SHR в наибольшей степени отмечено в группе с экспериментальным атеросклерозом. Повышение маркеров метал-комбилизируемой ОМБ свидетельствует об истощении антиоксидантных резервов в митохондриях. Возможно у SHR крыс с атеросклерозом высокая интенсивность оксидативного стресса связана с меньшим содержанием микопротенов высокой плотности как антиоксидантного соединения [8].

В митохондриях миокарда SHR крыс с сахарным диабетом более высокая интенсивность метал-индуцированной ОМБ вероятнее всего обусловлена нарушением реакций пентозофосфатного шунтина дефицитом НАДФН, необходимого для нормального функционирования глутатионового звена тиол-дисульфидный системы [9]. Все эти данные свидетельствуют о формировании АФГ-зависимой митохондриальной дисфункции миокарда SHR крыс, особенно в условиях неблагоприятного метаболического фона, вызванного атеросклерозом или сахарным диабетом.

Выводы.

1. Наиболее высокая пероксидантная реакция митохондрий кардиомиоцитов отмечается в группе животных экспериментальным сахарным диабетом. В то же время у животных с атеросклерозом зафиксировано наибольшее истощение антиоксидантных резервов.

2. Степень открытия митохондрий – достоверно выше у спонтанно гипертензивных крыс по сравнению с контролем, прогрессивно увеличиваясь на фоне экспериментального сахарного диабета и атеросклероза.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Джунисов А.К., Ошакбаев К.П., Аманов Т.И., Шынгисова Ф.С. и др Проблема сердечно-сосудистых заболеваний в Республике Казахстан и рекомендации по улучшению ситуации // Республикаанская НПК "Перспективы развития паппилативной помощи в Республике Казахстан". – Алматы, 2006, июнь (спец. выпуск терапевтического вестника).
- [2] Постнов Ю.В. К развитию мембранный концепции патогенеза первичной гипертензии (нарушенная функция митохондрий и энергетический дефицит) // Кардиология. – 2000. – № 10. – С. 4-12.

- [3] Dorshuk A.D. [ma in.] Сниженная АТФ-синтезирующая способность митохондрий клеток головного мозга крыс со спонтанной гипертензией (SHR) // Кардиология. – 2004. – № 3. – С. 64-65.
- [4] Walther T. [et al] Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension –induced heart disease // Circulation. 2007. – Vol. 115. – P. 333-334.
- [5] Gustaffson A., Gottlieb R. Heart mitochondria :gates of life and death // Cardiovascular Research. – 2008. – Vol. 77. – P. 334-343.
- [6] Judge S., Leeuwenburgh C. Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress and ageing // Am J Physiol Cell Physiol. – 2007. – Vol. 292(6). – P. 1983-1992.
- [7] Беленичев И.Ф. и др. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропroteкция цереброкурином // Международный неврологический журнал. – 2008. – № 4(20). – С. 20-26.
- [8] Harrison C. [et al.] Mitochondrial oxidative stress significantly influences atherogenic risk and cytokine-induced oxidant production // Environ Health Perspect. – 2011. – № 119(5). – P. 676-681.
- [9] Pitocco D. [et al.] Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes // Rev Diabet Stud. – 2010. – Vol. 7(1). – P. 15-25.

REFERENCES

- [1] Dzhunisov A.K., Oshakbaev K. P., Amanov T. I., Shyngisova F. S i dr Problema serdechno-sosudistyh zabolovanij v respublike Kazahstan i rekomendacii po uluchsheniju situacii / Respublikanskaja NPK « Perspektivy razvitiya pappilativnoj pomoshhi v Respublike Kazahstan» Almaty. 2006. iyun' (spec. Vypusk terapevticheskogo vestnika).
- [2] Postnov Ju.V. K razvitiyu membrannoj konsepcii patogeneza pervichnoj gipertenzii (narushennaja funkcija mitohondrij i jenergeticheskij deficit) // Kardiologija, 2000. №10. S. 4-12.
- [3] Dorshuk A.D. [ma in.] Snizhennaja ATF-sintezirujushhaja sposobnost' mitohondrij kletok golovnogo mozga krys so spontannoj gipertenziej (SHR) // Kardiologija. 2004. №3. S.64-65
- [4] Walther T. [et al] Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension –induced heart disease // Circulation. 2007. Vol. 115. P. 333-334.
- [5] Gustaffson A., Gottlieb R. Heart mitochondria :gates of life and death // Cardiovascular Research. 2008. Vol. 77. P. 334-343.
- [6] Judge S Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress and ageing/ S. Judge, C. Leeuwenburgh // Am J Physiol Cell Physiol. 2007. Vol. 292(6). P. 1983-1992.
- [7] Belenichev I.F. [i dr.] Mitochondrial'naja disfunkcija pri cerebral'noj patologii. Nejroprotekcija cerebrokuronom // Mezhdunarodnyj nevrologicheskij zhurnal. 2008. №4 (20). S. 20-26.
- [8] Harrison C. [et al.] Mitochondrial oxidative stress significantly influences atherogenic risk and cytokine-induced oxidant production // Environ Health Perspect. – 2011. № 119 (5). P. 676-681.
- [9] Pitocco D. [et al.] Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes // Rev Diabet Stud. 2010. Vol. 7(1). P. 15-25.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬДЫҚ ЖАNUАRLАРДАҒЫ ГИPERTONИЯ МЕН ҚАНТТЫ ДИАБЕТ КЕЗІНДЕ КАРДИОМИОЦИТТЕРДІҢ МИТОНДРИАЛЬДЫҚ ФРАКЦИЯЛАРЫНДАҒЫ БЕЛОКТАР ТОТЫГУНЫҢ БҰЗЫЛЫСТАРЫ

С. Н. Жумашов, Б. Т. Таствирова, Б. С. Жумашов, А. Н. Омарова

К. А. Ясауи атындағы Халықаралық қазак-түрік университеті, Түркістан, Қазақстан

Түйін сөздер: гипертония, митохондрия, кардиомиоцит, қант диабеті.

Аннотация. Жануарларда атеросклероз кезінде антиоксиданттық жүйе резервтерінің азаоны, ал экспериментальдық қантты диабет пен атеросклероз кезінде үдемелі жоғарылайды.

Поступила 05.04.2016 г.