

УДК 577.115.3+576.311.347

© О.С. Панасюк, А. М. Шиш, О.О. Мойбенко, 2012.

ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСИЧЕНІ ЖИРНІ КИСЛОТИ ПОПЕРЕДЖУЮТЬ НАБУХАННЯ СУБСАРКОЛЕМАЛЬНОЇ ТА ИНТЕРФІБРИЛЯРНОЇ ФРАКЦІЙ МІТОХОНДРІЙ МІОКАРДА

О.С. Панасюк, А. М. Шиш, О.О. Мойбенко*Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця, відділ загальної та молекулярної патології (керівник – академік, д.м.н. О.О. Мойбенко), м. Київ.*

Ω-3 POLYUNSATURATED FATTY ACID PREVENTS SWELLING OF SUBSARCOLEMAL AND INTERFIBRILLAR MITOCHONDRIA FRACTIONS OF MYOCARDIUM

O.S. Panasiuk, A.M. Shysh, O.O. Moibenko

SUMMARY

The influence of ω-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) on calcium-induced mitochondria swelling was studied. It has been established the difference in swelling between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria fractions after treatment with ω-3 PUFA. In the control group, there was no difference in Ca²⁺-induced swelling in these fractions. It has been shown what after treatment with ω-3 PUFA subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria fractions are less sensible to calcium-induced swelling, but the protective effect of ω-3 PUFA is more pronounced for the interfibrillar mitochondria.

ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ПРЕДУПРЕЖДАЮТ НАБУХАНИЕ СУБСАРКОЛЕМАЛЬНОЙ И ИНТЕРФИБРИЛЛЯРНОЙ ФРАКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДА

О.С. Панасюк, А. М. Шиш, О.О. Мойбенко

РЕЗЮМЕ

В работе изучали влияние ω-3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) на кальций-индуцированное набухание митохондрий. Выявлена разница в набухании между интерфибриллярной и субсарколемальной фракциями митохондрий при влиянии ω-3 ПНЖК. В условиях контроля, такие фракции митохондрий проявляют одинаковую чувствительность к кальций-индуцированому набуханию. Показано, что при влиянии ω-3 ПНЖК интерфибриллярная и субсарколемальная фракции митохондрий менее чувствительны к кальций-индуцированому набуханию, при этом защитное влияние ω-3 ПНЖК на интерфибриллярные митохондрии было более выраженным.

Ключові слова: мітохондрії, субсарколемальні, інтерфібрілярні, ω-3 поліненасичені жирні кислоти

З літературних джерел відомо, що в кардіоміоцитах є дві функціонально різні субпопуляції митохондрий, локалізованих в різних регіонах клітини: субсарколемальні, розташовані під сарколемою та інтерфібрілярні, розташовані між міофібрилами [2, 6, 8]. Різниця між цими двома митохондріальними субпопуляціями заключається в білковому і ліпідному складі, біохімічних властивостях та функціях [2]. Хоча інтерфібрілярна митохондріальна фракція досягає 80% загального митохондріального вмісту [2, 5], більшість досліджень на ізольованих митохондріях, виконано на субсарколемальній субпопуляції.

Як показано нами раніше та в інших роботах, ω-3 поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) підвищують стійкість серця до патологічних впливів (ішемія-реперфузія, стрес та ін.) [1, 4]. Щодо зміни функцій органел кардіоміоцитів, зокрема митохондрий під впливом ω-3 ПНЖК, то це питання і досі лишається нез'ясованим. Існують лише поодинокі роботи [9], в яких показано, що збагачення раціону на ω-3 ПНЖК призводить до зміни жирнокислотного складу фосфоліпідів органел серця та збільшення співвідношення ω-3/ω-6 ПНЖК. Дані Рере S. свідчать, що включення ω-3 ПНЖК в фосфоліпиди митохондрий

та саркоплазматичний ретикулум серця запобігає перенавантаженню Ca²⁺ митохондрий та зменшує пошкодження серця після ішемії-реперфузії [10]. Однак, лишається нез'ясованим питання впливу ω-3 ПНЖК на субсарколемальну та інтерфібрілярну фракцію митохондрий серця за дії індуктора набухання.

Мета роботи - виявити можливу різницю в чутливості до підвищеного вмісту в середовищі іонів кальцію між субсарколемальною та інтерфібрілярною фракціями митохондрий в умовах контролю та за впливу ω-3 ПНЖК.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У роботі використовували 2 групи щурів: 1- контрольна, 2- тварини, яких годували ω-3 ПНЖК (0.1мл/100г маси тіла). Дві субпопуляції митохондрий серця виділяли відповідно до методу описаного Palmer 1977[7]. Серця промивались льодовим 0.9% NaCl та подрібнювались в буфері А (цукроза 250, тріс-НСІ 20, рН 7.2), який містив 1 ммоль/л EGTA, 0.5% BSA. Подрібнена тканина гомогенізувалась тefлоновим гомогенізатором. Гомогенат центрифугувався при 700 Ч г та 2°C, з супернатанту виділялись субсарколемальні митохондрії методом диференційного центрифугування. Осад, що

залишився, ресуспендували в буфері А, і обробили Nagarse (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, США) в концентрації 2,5мг/г тканини і гомогенізували одразу. Гомогенат розводили в 2 рази буфером А і з нього виділяли інтерфібрилярні мітохондрії диференційним центрифугуванням.

Дослідження набухання мітохондрій проводили методом спектрофотометричної реєстрації, для цього мітохондрії поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (ммоль/л): КСl - 120, тріс-НСl -10, KH_2PO_4 -10; рН 7,4, сукцинат натрію -10 з додаванням 5 μM ротенону і реєстрували зниження оптичної густини суспензії мітохондрій при $\lambda=520\text{nm}$ за 5хв до і впродовж 10хв їх набухання за наявності індуктора мітохондріальної пори - кальцію. Зміну рівня набухання мітохондрій визначали як відношення між показником набухання мітохондрій на 15хв відносно вихідного значення. Набухання мітохондрій індукували додаванням CaCl_2 на 5тій хвилині інкубації в кінцевій концентрації 10^{-4}M . Концентрація білка становила 0,1мг/мл. Як контроль використовували суспензію мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора з подальшою реєстрацією оптичної густини протягом 15хв.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням тест-критерію Стьюдента, значення $P<0,05$ розглядали як достовірне.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті наших досліджень було виявлено, що в контрольній групі, інтерфібрилярні та субсарколемальні мітохондрії проявляють однакову чутливість до кальцію. Так, в безкальцієвому середовищі, хід зниження світлопоглинання, що відповідає набухання мітохондрій, не відрізнявся між субсарколемальною та інтерфібрилярною фракціями

в контрольній групі (до $0,81\pm 0,01$ та $0,80\pm 0,02$ на 15хв, відповідно) (табл.1). Також виявлено, що при відсутності іонів Ca^{2+} , субсарколемальні мітохондрії з контрольної та експериментальної груп не мали суттєвої різниці в набуханні (табл.1). На відміну від цього в інтерфібрилярній фракції мітохондрій, застосування ω -3 ПНЖК призводить до зменшення набухання мітохондрій в безкальцієвому середовищі на 13,75% (зниження світлопоглинання до $0,91\pm 0,02$), порівняно з контрольною групою ($0,80\pm 0,02$ ($P<0,05$)) (табл.1). Тобто ω -3 ПНЖК попереджують набухання інтерфібрилярної фракції мітохондрій на відміну від субсарколемальної в умовах контролю.

Нами показано, що після додавання CaCl_2 (100 μM) підвищується величина набухання мітохондрій як субсарколемальної (до $0,63\pm 0,05$) так і інтерфібрилярної (до $0,65\pm 0,06$) фракцій контрольної групи.

За умов застосування ω -3 ПНЖК реакція субсарколемальних мітохондрій на присутність іонів Ca^{2+} була меншою на 12,6% порівняно з групою без застосування ω -3 ПНЖК (табл.1). Також і в інтерфібрилярній фракції мітохондрій за цих же умов величина набухання мітохондрій була на 27,6% нижче ніж в контролі (табл.1).

Слід зазначити, що інтерфібрилярна фракція мітохондрій виявилася менш чутливою до кальцій-індукованого набухання порівняно до субсарколемальної фракції мітохондрій в умовах застосування ω -3 ПНЖК. Так, показник набухання інтерфібрилярної фракції мітохондрій був на 16,9% нижчим ніж субсарколемальної, що вказує на зменшену чутливість до перенавантаження Ca^{2+} інтерфібрилярної фракції після застосування ω -3 ПНЖК.

Таблиця 1

Набухання субсарколемальної та інтерфібрилярної фракцій мітохондрій в умовах контролю та за впливу ω -3 поліненасичених жирних кислот

Фракції мітохондрій	Оптична щільність суспензії мітохондрій, D_{520}	
	середовище без Ca^{2+}	середовище з додаванням Ca^{2+}
субсарколемальна	$0,81\pm 0,01$	$0,63\pm 0,05$
субсарколемальна + ω -3 ПНЖК	$0,81\pm 0,01$	$0,71\pm 0,06^*$
інтерфібрилярна	$0,80\pm 0,02$	$0,65\pm 0,06$
інтерфібрилярна+ ω -3 ПНЖК	$0,91\pm 0,02^{*\#}$	$0,83\pm 0,01^{*\#}$

Примітка: *вірогідно у порівнянні з контрольною групою; # вірогідно у порівнянні з субсарколемальними мітохондріями з ω -3 ПНЖК; $p<0,05$.

Набухання мітохондрій у відповідь на CaCl_2 попереджувалось додаванням циклоспорину А (данні не представлені), вказуючи на те, що кальцій індуковане набухання мітохондрій вірогідно відображає відкриття мітохондріальної пори змінної проникності.

Виявлена нами різниця в чутливості до кальцій-індукованого набухання під впливом ω -3 ПНЖК може залежати саме від різних субпопуляцій мітохондрій. Вважається, що дія ω -3 ПНЖК зумовлена вбудовуванням ейкозапентаєнової та докозагексаєнової кислот в клітинну і мітохондріальну мембрани [10].

Зміни жирнокислотного складу мітохондріальних мембран може змінювати не тільки фізичні характеристики мембрани, але і модифікувати активність мітохондріальних іонних каналів, що ймовірно веде до захисту мітохондрій при кальцій-індукованому пошкодженні. Наслідком застосування ω -3 ПНЖК можуть бути змінені мітохондріальні Ca^{2+} чи K^{+} струми. Відомо, що активація мітохондріальних АТФ-залежних калієвих каналів веде до інгібування мітохондріальної пори [3]. Так як активація K^{+} каналів веде до кардіопротекції, ефект ω -3 ПНЖК може бути зумовлений зміною активності чи експресії цих каналів. Також на нашу думку ефект ω -3 ПНЖК може бути зумовлений впливом на регуляторні механізми мітохондріальної пори.

Таким чином, отримані нами результати свідчать, що інтерфібрилярна та субсарколемальна фракції мітохондрій в умовах контролю проявляють однакову чутливість до кальцій-індукованого набухання. Доведено, що застосування ω -3 ПНЖК захищає обидві мітохондріальні фракції від кальцій-індукованого набухання. Встановлено, що протекторний ефект ω -3 ПНЖК значно більш виражений для інтерфібрилярної ніж для субсарколемальної фракцій мітохондрій, вказуючи на те, що ступінь мітохондріальної функціональної гетерогенності може зростати при патологічних умовах, таких як кальцієве перенавантаження.

ЛІТЕРАТУРА

1. 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.
2. Adhichetty P.J., Ljubicic V., Menzies K.J., Hood D.A. Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. // *Am J Physiol Cell Physiol.* - 2005. - Vol. 289. - P.C994-C1001.
3. Costa A.D., Jakob R., Costa C.L., Andrukhiv K., West I.C., Garlid K.D. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K^{+} channel opening and H_2O_2 inhibit the mitochondrial permeability transition. // *J Biol Chem.* - 2006. - Vol. 281. - P.C20801-C8.
4. Demaison L., Moreau D., Vergely-Vandriessse C., Gregoire S., Degois M., Rochette L. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids and hepatic steatosis on the functioning of isolated working rat heart under normoxic conditions and during post-ischemic reperfusion. // *Mol Cell Biochem.* - 2001. - Vol. 224. - P.C103-C16.
5. Hoppeler H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. // *Int J Sports Med.* - 1986. - Vol.7. - P.C187-C204.
6. O'Shea K.M., Khairallah R.J., Sparagna G.C., Xu W., Hecker P.A., Robillard-Frayne I., Des Rosiers C., Kristian T., Murphy R.C., Fiskum G., Stanley W.C. Dietary omega-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca^{2+} -induced permeability transition. // *J Mol Cell Cardiol.* - 2009. - Vol. 47. - P.C819-C27.
7. Palmer J.W., Tandler B., Hoppel C.L. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. // *J Biol Chem.* - 1977. - Vol. 252(23). - P.C8731-C9.
8. Palmer J.W., Tandler B., Hoppel C.L. Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. // *Am J Physiol.* - 1986. - Vol. 250. - P.C741-C8.
9. Pepe S. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on age-related changes in cardiac mitochondrial membranes. // *Exp Gerontol.* - 2005. - Vol. 40(8-9). - P.C751-C8.
10. Pepe S. Mitochondrial function in ischaemia and reperfusion of the ageing heart. // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* - 2000. - Vol.27. - P.C745-C50.