

Ю.М. Колесник, М.Ю. Колесник, А.В. Абрамов

## Маркери ремоделювання міокарда щурів при артеріальній гіпертензії та експериментальному цукровому діабеті: роль мітохондріальної дисфункції

*Досліджували експресію кардіотрофіну-1, анексину V, тайтину та колагену I типу в міокарді щурів лінії Вістар (контроль), а також у щурів зі спонтанною гіпертензією та з експериментальним цукровим діабетом і без нього. На мітохондріях, ізольованих із тканини серця, вивчали проникність мітохондріальної пори під впливом  $Ca^{2+}$ . Встановлено, що у щурів зі спонтанною гіпертензією та супутнім діабетом питомих вміст кардіотрофіну-1, анексину V та колагену I типу у міокарді був достовірно вищим порівняно зі значеннями у контрольних щурів і щурів з гіпертензією без діабету. Питомий вміст тайтину був на 27 % нижчим у тварин з гіпертензією та діабетом, ніж у щурів зі спонтанною гіпертензією без діабету. Вказані зміни експресії кардіотрофіну-1, анексину V, тайтину та колагену I типу асоціювалися з найбільшою чутливістю мітохондріальної пори до  $Ca^{2+}$  у щурів зі спонтанною гіпертензією та супутнім цукровим діабетом.*

*Ключові слова: кардіотрофін-1, анексин V, тайтин, колаген I типу, мітохондріальна пора, міокард, щури, гіпертензія, цукровий діабет.*

### ВСТУП

Артеріальна гіпертензія залишається одним з найбільш поширених захворювань і відіграє провідну роль у структурі загальної та кардіоваскулярної смертності [1]. Старіння населення у всьому світі, збільшення тривалості життя змушує розглядати цю проблему крізь призму коморбідних станів. У клінічній практиці гіпертензія часто поєднується із цукровим діабетом, що значно погіршує прогноз [2]. Обидва захворювання тісно пов'язані між собою спільними патогенетичними механізмами, ключовими з яких є інсулінорезистентність, активація симпатичної та ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, прозапальна активація, оксидативний стрес тощо [3–6]. Одним з ключових органів ураження при обох захворюваннях є серце [7]. Патологічне ремоделювання серцевого м'яза полягає у формуванні гіпертрофії та розвитку інтерстиціального фіброзу, переважно за

рахунок накопичення колагену I та III типу, а також ініціації процесів апоптозу кардіоміоцитів. Ці зміни є морфологічним підґрунтям до формування діастолічної дисфункції та потенціально злоякісних аритмій [8, 9]. Важливим аспектом досліджень є пошук адекватних маркерів, що характеризують фундаментальні процеси патологічного ремоделювання міокарда. Вони повинні відповідати наступним вимогам: мати кардіальне походження, відображувати певний патологічний процес, бути прогностично значущими та чутливими до впливу антигіпертензивної терапії [10].

Переважна частина досліджень формування міокардіального фіброзу присвячена процесам синтезу та деградації колагену I і III типу та активації системи матричних металопротеїназ [11–14]. Але в останні роки активно вивчається роль гігантського білка тайтину, що контролює пружність міокарда та є регулятором адаптаційної відповіді на зміни екстрацелюлярного матриксу. Тайтин формує

третю філаментну систему в міофібрилах разом з актином та міозином. Існують дані, що збільшення міокардіальної жорсткості при гіпертензії та діабеті є результатом координуваних змін вмісту колагену та тайтину [15].

Серед перспективних маркерів, що відображає процеси гіпертрофії при гіпертензії та діабеті, розглядається кардіотрофін-1 [16, 17]. Цей представник сімейства інтерлейкіну-6 здатен стимулювати гіпертрофію та гіперплазію кардіоміоцитів. Експресія кардіотрофіну-1 збільшується у відповідь на розтягнення камер серця та підвищену міокардіальну жорсткість ще до реакції системи натрійуретичних пептидів.

Формування “гіпертензивного” серця включає також ранню ініціацію процесу апоптозу. Високоспецифічним маркером ідентифікації кардіоміоцитів, що знаходяться у стані апоптозу, розглядається анексин V. Він має високу афінність до фосфатидилсерину, який експресується на поверхні апоптотичних клітин. Його транслокація з внутрішньої до зовнішньої мембрани кардіоміоцита є однією з найбільш ранніх стадій апоптозу.

Одним з головних «диригентів» ремоделювання міокарда при поєднанні діабету та гіпертензії вважається мітохондріальна дисфункція [18, 19]. У деяких працях було показано, що системне підвищення артеріального тиску може бути результатом енергодефіциту [20, 21]. Важливим регулятором діяльності мітохондрій є гігантська пора. Вона являє собою високоселективний потенціалзалежний іонний канал внутрішньої мембрани мітохондрій діаметром 3 нм [22]. Перевантаження кальцієм призводить до відкриття пори, роз'єднання процесу окисного фосфорилування. У результаті відбувається надлишкове надходження води до мітохондрій, їх набрякання та розрив зовнішньої мітохондріальної мембрани з виходом проапоптотичних факторів у цитозоль. Вважається, що мітохондрії беруть участь у ключових патологічних процесах, що зумовлюють морфофункціональний стан міокарда при

гіпертензії та діабеті, а саме – гіпертрофії, апоптозі та інтерстиціальному фіброзі. Проте ця проблема вивчена недостатньо.

Метою нашої роботи стало вивчити експресію маркерів гіпертрофії, фіброзу та апоптозу у щурів зі спонтанною гіпертензією та експериментальним цукровим діабетом, а також з'ясувати можливу роль мітохондріальної дисфункції в цих процесах.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на базі Центральної науково-дослідної лабораторії Запорізького державного медичного університету. Експериментальних щурів-самців було розподілено на три групи по 10 тварин у кожній. До I групи (контроль) ввійшли щури лінії Вістар масою 220–270 г, до II – щури зі спонтанною гіпертензією (SHR), масою 220–300 г, до III – щури лінії SHR, масою 220–300 г у яких моделювали цукровий діабет одноразовим інтраперитоніальним введенням стрептозоточину у дозі 50 мг/кг, розчиненого у 1 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 4,5) після 12-годинного голодування. Протягом першої доби щурів III групи поїли 20%-м розчином глюкози, а протягом другої – 10%-м. Дослідження проведено згідно з «Положенням про використання тварин у біомедичних дослідженнях», що узгоджені з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей».

У всіх тварин вимірювали систолічний артеріальний тиск методом плетизмографії за допомогою прилада Transonic Animal Research Flowmeter T-106 Series («Transonic Systems Inc.», США). Реєстрацію проводили тричі.

Після декапітації тварин під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) виділяли фрагменти міокарда, переважно з верхівки серця. Мітохондріальну фракцію отримували методом диференційного центрифугування на рефрижераторній центрифугі Sigma 3-30K («Sigma

Laborzentrifugen GmbH», Німеччина) при 4 °C [23]. Спочатку гомогенат центрифугували 7 хв при 700 g для осадження клітинних фрагментів, а потім 15 хв при 11000 g. Для реєстрації відкриття мітохондріальної пори вносили суспензію мітохондрій до інкубаційної суміші, що складалася з (ммоль/л): KCl – 120,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5, глутамату – 2, малату – 1, тріс-НСl-буфера – 20 (рН 7,4). Процес відкриття пори досліджували спектрофотометричним методом на приладі Libra S32 PC («Biochrom Ltd.», Велика Британія). До інкубаційного середовища вносили 50 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ . Інтенсивність процесу відкриття мітохондріальної пори характеризували зниженням оптичної щільності досліджуваних зразків (DE).

Дослідження маркерів міокардіального фіброзу, гіпертрофії та апоптозу проводили методом імуногістохімії. Фрагменти лівого шлуночка тварин фіксували у рідині Буена та після гістологічної обробки заливали у парапласт («McCormick», США). На ротатійному мікромомі Microm-325 («Microm Corp.», Німеччина) отримували серійні зрізи з різних відділів лівого шлуночка товщиною 5 мкм. Зрізи депарафінували та демаскували в РТ-модулі («Thermo Scientific», США) у цитратному буферному розчині («Thermo Scientific», США).

Для визначення експресії колагену I типу та тайтину гістологічні зрізи інкубували з мишачими моноклональними антитілами («Abcam», США) у розчині 1:1000 у вологій камері (+4 °C, 24 год). Потім інкубували з овечими антитілами до імуноглобуліну G (IgG) миші, кон'югованими з FITC («Sigma Chemical», США), у розведенні 1:64 у вологій камері (+37 °C, 45 хв) та заключали у суміш гліцерин-фосфатний буфер (9:1).

Для визначення вмісту кардіотрофіну-1, що є потужним індуктором гіпертрофії міокарда, проводили інкубацію зразків з кролячими поліклональними антитілами («Novus Biologicals», США) у розведенні 1:200 у вологій камері (+4 °C, 24 год). Як вторинні

антитіла використовували козячі антитіла до IgG кролика, які були кон'юговані з FITC («Sigma Chemical», США), у розведенні 1:64 у вологій камері (+37 °C, 45 хв) та заключали у суміш «гліцерин/фосфатний буфер» (9:1).

При дослідженні клітинної загибелі через апоптоз інкубували зразки міокарда з кролячими поліклональними антитілами до анексину V («Abcam Inc.», США) у розведенні 1:200 у вологій камері (+4 °C, 24 год). Потім проводили інкубацію з козячими антитілами до IgG кролика, кон'югованими з FITC («Sigma Chemical», США), у розведенні 1:64 у вологій камері (+37 °C, 45 хв) та заключали у суміш гліцерин-фосфатний буфер (9:1).

Гістологічні зрізи досліджували в ультрафіолетовому спектрі збудження за допомогою світлофільтра 38HE з високою емісією («Carl Zeiss», Німеччина) на мікроскопі AxioImager-M2 («Carl Zeiss», Німеччина). Зображення отримували з відеокамери AxioCam-5HRm («Carl Zeiss», Німеччина) та записували у вигляді комп'ютерного файлу з наступною обробкою системою цифрового аналізу зображення AxioVision 4.8.2 («Carl Zeiss», Німеччина, № ліцензії KONS18473).

Для кожного із маркерних білків (тайтину, колагену I типу, кардіотрофіну-1 та анексину V) у кожній експериментальній серії досліджували не менше ніж 100 відеокадрів, в яких в автоматичному режимі виділялися зони зі статистично значущою флюоресценцією, після математичної обробки яких статистичному аналізу піддавали такі показники:

1) питома площа матеріалу, імунореактивного до маркерного білка, відносно площі міокарда у відеокадрі. Цей показник відображує інтенсивність експресії досліджуваних маркерів у міокарді;

2) інтенсивність флюоресценції імунореактивного матеріалу в умовних одиницях флюоресценції, яка відображує концентрацію маркерного білка у міокарді;

3) питомих вміст досліджуваних маркерних білків у міокарді, який розраховувався як множина питомої площі імунореактивного ма-

теріалу та інтенсивності її флюоресценції. За цим показником можна оцінювати загальний рівень експресії маркерного білка у міокарді.

Для характеристики фібротичних змін у міокарді додатково розраховували тайтин/колагеновий коефіцієнт, як співвідношення питомого вмісту тайтину в міокарді до питомого вмісту колагену I типу.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою пакету програм «Statistica 6.0» («StatSoft», США, № ліцензії AXXR712D833214FAN5). Порівняльний аналіз у групах проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з використання критерію Н'юмена-Кейлса post hoc. Статистично значущими вважали відмінності при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Значення систолічного артеріального тиску у щурів лінії Вістар становило  $126 \pm 3$  мм рт.ст., а у щурів лінії SHR –  $155 \pm 5$  мм рт.ст. ( $P < 0,05$ ).

При дослідженні міокардіального фіброзу було зареєстровано, що питомий вміст колагену I типу був вдвічі вищим у щурів зі спонтанною гіпертензією порівняно з контролем. А у щурів зі спонтанною гіпертензією з експериментальним цукровим діабетом (III група) цей показник збільшувався майже у 5 разів (таблиця).

Важливим чинником формування надлишкового фіброзу при діабеті є глікозування колагену, що робить його стійким до протеолізу [24]. Також гіперглікемія здатна підвищувати експресію ангіотензину-II,  $\beta$ -трансформуючого фактора росту, знижувати активність матриксних металопротеїназ, що впливають на стан екстрацелюлярного матриксу [25]. Дія глюкози збільшує експресію генів колагену I, III та VI типу у кардіальних фібробластах, а також впливає на їх міграцію, проліферацію та диференціацію [26]. Внаслідок цього збільшується міокардіальна жорсткість, що призводить до порушення діастолічної функції міокарда.

Проте формування міокардіального фібро-

Показники експресії тайтину, колагену I типу, кардіотрофіну-1 та анексину V в міокарді щурів ( $M \pm m$ )

Показник	Контроль (I група)	Щури зі спонтанною гіпертензією (II група)	Щури зі спонтанною гіпертензією та діабетом (III група)
Площа флюоресценції до тайтину, %	$100 \pm 1,6$	$123,6 \pm 0,9^*, ***$	$102 \pm 0,97$
Інтенсивність флюоресценції тайтину, %	$100 \pm 5,26$	$126,3 \pm 4,2^*, ***$	$110,5 \pm 5,26$
Питомий вміст тайтину, %	$100 \pm 4,98$	$152,9 \pm 5,11^*, ***$	$111,6 \pm 4,8$
Площа флюоресценції до колагену I типу, %	$100 \pm 7,5$	$135 \pm 6,25^*$	$140 \pm 6,05^*$
Інтенсивність флюоресценції колагену I типу, %	$100 \pm 5,88$	$132,3 \pm 2,94^*, ***$	$323 \pm 2,94^*, **$
Питомий вміст колагену I типу, %	$100 \pm 10,6$	$205,2 \pm 13,2^*, ***$	$506,6 \pm 25,9^*, **$
Тайтин/колагеновий коефіцієнт, %	$100 \pm 5,3$	$74,3 \pm 4,8^*, ***$	$22,1 \pm 1,85^*, **$
Площа флюоресценції до кардіотрофіну-1, %	$100 \pm 1,43$	$142,8 \pm 1,43^*, ***$	$126,9 \pm 1,76^*, **$
Інтенсивність флюоресценції кардіотрофіну-1, %	$100 \pm 2,16$	$122,3 \pm 4,31^*, ***$	$270,5 \pm 12,2^*, **$
Питомий вміст кардіотрофіну-1, %	$100 \pm 3,03$	$118,3 \pm 4,63^*, ***$	$315 \pm 13,3^*, **$
Площа флюоресценції до анексину V, %	$100 \pm 1,15$	$111,5 \pm 1^*, ***$	$128,8 \pm 0,65^*, **$
Інтенсивність флюоресценції анексину V, %	$100 \pm 3,17$	$119 \pm 3,97^*$	$119 \pm 4,76^*$
Питомий вміст анексину V, %	$100 \pm 3,1$	$107 \pm 3,4$	$110,4 \pm 4,3$

Примітка. Результати представлено у відсотках відносно контролю (100 %). \* $P < 0,05$  щодо контролю, \*\* $P < 0,05$  щодо значень щурів II групи, \*\*\* $P < 0,05$  щодо значень щурів III групи.



зу є досить складним процесом. Дослідженнями останніх років встановлено важливу роль гігантського білка тайтину, що контролює пружність міокарда. Його молекули, перекриваючи відстань від М-лінії до Z-диска, формують третю філаментну систему в міофібрилах. У міокарді тайтин має дві ізоформи - N2BA и N2B, що відрізняються ступенем пружності (у співвідношенні 30:70 у нормі). За нашими результатами, у щурів лінії SHR без діабету (II група) зареєстровано достовірне збільшення площі, інтенсивності флуоресценції та питомого вмісту тайтину у міокарді порівняно з контролем. Водночас при моделюванні цукрового діабету вказані параметри не відрізнялися від контрольних значень. А питомий вміст тайтину у щурів лінії SHR з діабетом (III група) був нижчим, ніж у щурів зі спонтанною гіпертензією (II група; див. таблицю). Раніше Ge та співавт. [27] зафіксували зниження експресії мРНК тайтину у “нормотензивних” щурів лінії Sprague-Dawley із стрептозотоциніндукованим діабетом. Взаємовідношення колагену і тайтину, їх вплив на міокардіальну жорсткість є недостатньо вивченими. Вважається, що тайтин контролює розтягнення міофібрил у фізіологічних межах, а колаген перешкоджає надмірному розтягненню міокарда. Нами було запропоновано коефіцієнт співвідношення між питомим вмістом тайтину та колагену I типу, який засвідчив найбільшу схильність до прогресування фібротичних змін у III групі щурів. Поступове зниження загального вмісту тайтину призводить до маніфестації серцевої недостатності, а на більш ранніх стадіях хвороби змінюється тільки ізоформний склад цього протеїну [28]. Так, Wagen [29] виявив зменшення вмісту розтяжної N2BA-ізоформи тайтину у щурів лінії SHR. Дослідження щодо впливу фіброзу на стан та ізоформний склад тайтину є суперечливими. У праці Chung та співавт. [30] у експериментальних мишей з генетично дефектним тайтином міокардіальна жорсткість збільшувалася незалежно від вираженості

фіброзу, що оцінювали за рівнем експресії колагену I типа. Автори дійшли висновку, що для збільшення жорсткості міокарда вже є достатнім ізольоване порушення функціонування тайтину. Інші дослідники вважають, що зміни тайтину є адаптаційною відповіддю на зміни екстрацелюлярного матриксу. У праці Makagenko та співавт. [28] зниження загального вмісту та переважання більш розтяжної N2BA-ізоформи білка при ішемічній кардіоміопатії асоціювалося з надлишковим накопиченням колагену та десміну.

Формування гіпертрофії є першим компенсаторним механізмом адаптації до збільшеного судинного опору при гіпертензії. На клітинному рівні цей процес характеризується збільшенням розмірів кардіоміоцитів. Кардіотрофін-1 секретується кардіоміоцитами та фібробластами у відповідь на біомеханічний стрес і під впливом ангіотензину-II. Після взаємодії із гетеродимерним рецепторним комплексом «глікопротеїн g130/рецептор фактора інгібіції лейкемії» кардіотрофін-1 активує різні сигнальні шляхи росту кардіоміоцитів. За нашими результатами у щурів зі спонтанною гіпертензією та цукровим діабетом реєструвалася найбільша експресія кардіотрофіну-1. Питомий вміст цього ліганда перевищував у 3,15 раза значення у контрольних тварин та в 2,67 раза – у щурів зі спонтанною гіпертензією. Pemberton та співавт. [31] продемонстрували, що у щурів лінії SHR тканинна концентрація кардіотрофіну-1 була на 25 % вищою порівняно з тваринами лінії Вістар-Кіото з нормальним тиском. Високий вміст кардіотрофіну-1 саме у тварин III групи може бути пов'язаним з безпосереднім впливом гіперглікемії [17]. Кардіотрофін-1 впливає на синтез ядерного фактора кВ, що стимулює гіпертрофію міокарда. Існують дані, що він відіграє важливу протективну роль відносно процесу апоптозу. У дослідженні Lopez і співавт. [12] наявність у культурі клітин кардіотрофіну-1 достовірно знижувала інтенсивність апоптозу кардіоміоцитів при стимуляції ангіотензином II

і реактивними формами кисню. У нашому дослідженні процес апоптозу оцінювали за рівнем експресії анексину V. Площа та інтенсивність флуоресценції цього маркера були достовірно вищими у тварин з гіпертензією. Найбільше значення цього показника було у щурів зі спонтанною гіпертензією та цукровим діабетом. Раніше Ravassa та співавт. [32] продемонстрували, що апоптотичний індекс кардіоміоцитів у щурів лінії SHR був у 1,38 раза вищим, ніж у тварин з нормальним тиском (лінія Вістар).

Таким чином, моделювання у щурів зі спонтанною гіпертензією експериментального цукрового діабету призводить до більш вираженого фіброзу, що відбувається без компенсаторного підвищення вмісту тайтину. При цьому реєструється також збільшення концентрації маркерів гіпертрофії та апоптозу.

Одним з головних чинників вищеописаних змін міокарда при поєднанні гіпертензії та цукрового діабету може бути мітохондріальна дисфункція. За результатами нашого дослідження, ступінь кальційіндукованого відкриття мітохондріальної пори був достовірно вищим у щурів зі спонтанною гіпертензією, ніж у контрольних тварин. Оптична щільність суспензій мітохондрій у тварин різних груп була такою:

Щури лінії Вістар (контроль)  $0,018 \pm 0,001$

Щури зі спонтанною гіпертензією  $0,146 \pm 0,012^*$

Щури зі спонтанною гіпертензією та експериментальним цукровим діабетом  $0,348 \pm 0,01^*, **$

\* $P < 0,05$  щодо контролю, \*\* $P < 0,05$  щодо значень у тварин зі спонтанною гіпертензією.

У щурів з гіпертензією та супутнім цукровим діабетом рівень набухання мітохондрій збільшувався майже вдвічі порівняно з тваринами з гіпертензією.

Раніше нами було встановлено, що за несприятливого метаболічного фону (гіперглікемія, інсулінорезистентність) реєструється дефіцит аденілових нуклеотидів і лактату в мітохондріальній фракції кардіоміоцитів, що

є передумовою виникнення енергодефіциту [33]. Дисфункція мітохондрій супроводжується також інтенсивною генерацією активних форм кисню, що призводить до пошкодження білків і ліпідів, а також інших клітинних компонентів. Було виявлено, що у щурів зі спонтанною гіпертензією та цукровим діабетом збільшується вміст продуктів окисної модифікації білків – альдегід- і кетонфенілгідрозонів. Іншим важливим фактором, який зумовлює мітохондріальну дисфункцію, є дефіцит оксиду азоту, що відіграє важливу роль у патогенезі гіпертензії. Раніше було встановлено, що у щурів лінії SHR з експериментальним цукровим діабетом знижується утворення нітрит-аніона та NO-синтази як у мітохондріях, так і в цитозолі міокарда [34]. При цьому у великій кількості з'являються цитотоксичні деривати NO, які знижують активність ендотеліальної NO-синтази. З іншого боку, реєструється пригнічення антиоксидантної системи клітини, зокрема тіол-дисульфідної.

Мітохондрії є чутливими до змін екстрацелюлярного матриксу міокарда, але, в свою чергу, можуть безпосередньо впливати на нього. Важливе значення у функціонуванні мітохондрій і формуванні міокардіального фіброзу має ангіотензин-II, активація котрого є однією з центральних ланок патогенезу як гіпертензії, так і діабету. За даними Коваленка та співавт. [35], у щурів зі спонтанною гіпертензією активність ангіотензинперетворюючого ферменту на 135 % вища, ніж у тварин з нормальним тиском. Ангіотензин-II стимулює надмірне утворення активних форм кисню у цитозолі та мітохондріях, порушуючи функціонування останніх. Після зв'язування з рецептором 1-го типу на поверхні плазматичної мембрани кардіоміоцита ангіотензин-II активує інтегринопосередковані зміни організації цитоскелета та екстрацелюлярного матриксу. Це не лише змінює механічні властивості міокарда, але й впливає на розподіл, структуру та функціонування мітохондрій [36]. При цьому формується «хибне коло», коли мітохондрії як найбільші продуценти

реактивних форм кисню через зміну своєї ультраструктури стають більш вразливими до їх токсичної дії. Альтернативним механізмом є активація реактивними формами кисню та ангіотензином – II трансформуючого фактора росту  $\beta$ , що є потужним індуктором синтезу колагену фібробластами [37].

В умовах цукрового діабету зниження кількості та порушення ультраструктури мітохондрій, їх дисфункція призводять до сповільнення процесу окиснення вільних жирних кислот, акумуляції ліпідів у цитозолі. Це порушує передачу внутрішньоклітинних сигнальних ефектів інсуліну [38].

Відомо, що мітохондрії беруть участь у процесі апоптозу. Так, навіть тимчасове та зворотне зниження вмісту АТФ у клітинах стимулює апоптоз через активацію білка p53, формування апоптосом та індукцію системи каспаз. Дефіцит макроергів, перевантаження кальцієм зумовлюють зниження мембранного потенціалу, відкриття мітохондріальної пори та визволення проапоптотичних факторів у цитозоль. У щурів лінії SHR переважну роль в ініціацію каспазопосередкованого шляху апоптозу має саме мітохондріальний шлях, що виникає в результаті енергодефіциту [39]. Механізмами, що можуть вплинути на апоптотичні процеси, є зменшення перевантаження матриксу мітохондрій іонами кальцію та пригнічення утворення вільних радикалів, попередження відкриття мітохондріальної пори та інгібування білка BCL<sub>2</sub> [40].

Сучасні схеми лікування артеріальної гіпертензії, що базуються на блокуванні нейрогуморальних систем, певною мірою поліпшили прогноз пацієнтів. Але вони лише опосередковано впливають на оксидативний стрес, що є однією з причин кардіальної патології. Оскільки мітохондрії є головними продуцентами реактивних форм кисню, то ці органели являють собою важливі мішені для нових терапевтичних засобів. Доведено позитивний вплив сірководню,  $\alpha$ -ліпоевої кислоти, пластохінону, в обмеженні мітохондріальної дисфункції [41]. Зокрема,

використання донаторів сірководню у щурів зі спонтанною гіпертензією чинило стабілізуювальну дію на мембрани мітохондрій, підвищуючи резистентність органел до природного індуктора відкриття мітохондріальної пори Ca<sup>2+</sup> [42]. Іншим способом обмеження утворення реактивних форм кисню є конкурентна активація цитохромоксидази донаторами NO, зокрема динітрозольними сполуками заліза. Вони вважаються клітинним депо NO та здатні вивільняти його при дефіциті. В експерименті з ізольованими мітохондріями донатори NO знижували утворення супероксиду. Запатентована форма динітрозольних сполук заліза «оксаком» на разі проходить клінічні випробування [43]. У дослідженні Мойбенка та співавт. [40] використання активатора K<sub>АТФ</sub>-каналів флокаліну запобігало перевантаженню мітохондрій Ca<sup>2+</sup>, відкриванню мітохондріальної транспортної пори, попереджуючи процес апоптозу.

Отже, експериментальний цукровий діабет у щурів зі спонтанною гіпертензією значно поглиблює існуючу мітохондріальну дисфункцію. Отримані результати вказують на важливу роль мітохондрій у процесах ремоделювання екстрацелюлярного матриксу, формування фіброзу та гіпертрофії, а також апоптозу кардіоміоцитів. Пошкодження цих органел призводить до надлишкової генерації активних форм кисню, що значно впливає на морфофункціональний стан міокарда. Застосування нових лікарських засобів, що здатні корегувати мітохондріальну дисфункцію, може відкрити нові терапевтичні можливості щодо покращення прогнозу хворих на артеріальну гіпертензію та цукровий діабет.

**Ю.М. Колесник, М.Ю. Колесник, А.В. Абрамов**

#### **МАРКЕРЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ МИОКАРДА У КРЫС ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО САХАРНОМ ДИАБЕТЕ: РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ**

Исследовали экспрессию кардиотрофина-1, аннексина V, тайтина и коллагена I типа в миокарде крыс линии Вистар

(контроль), а также крыс со спонтанной гипертензией и экспериментальным сахарным диабетом и без него. В митохондриях, изолированных из ткани сердца, изучали проницаемость митохондриальной поры под воздействием  $\text{Ca}^{2+}$ . Установили, что у крыс со спонтанной гипертензией и сопутствующим диабетом удельное содержание кардиотрофина-1, аннексина V и коллагена I типа в миокарде было достоверно выше по сравнению с животными с нормальным артериальным давлением и крысами с гипертензией без диабета. Удельное содержание тайтина было на 27 % ниже у крыс с гипертензией и диабетом, чем у животных с гипертензией без диабета. Указанные изменения экспрессии кардиотрофина-1, аннексина V, тайтина и коллагена I типа ассоциировались с наибольшей чувствительностью митохондриальной поры к  $\text{Ca}^{2+}$  у крыс со спонтанной гипертензией и сопутствующим сахарным диабетом.

Ключевые слова: кардиотрофин-1, аннексин V, тайтин, коллаген I типа, митохондриальная пора, миокард, крысы, гипертензия, сахарный диабет.

**Y.M. Kolesnyk, M.Y. Kolesnyk, A.V. Abramov**

#### **PATHOLOGICAL REMODELING OF MYOCARDIUM IN SPONTANEOUS HYPERTENSIVE RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS: THE ROLE OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION**

The expression of cardiotrophin-1, annexin V, titin and type I collagen was investigated in myocardium of normotensive Wistar rats and spontaneous hypertensive rats with and without experimental diabetes. The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial permeability transition pore was assessed in mitochondria isolated from rat hearts. The contents of cardiotrophin-1, annexin V and type I collagen in spontaneous hypertensive rats with diabetes were higher compared with that detected in the groups of normotensive rats and rats with diabetes. The cardiac titin level was 27 % lower in animals with hypertension and diabetes compared to spontaneous hypertensive rats without diabetes. The changes of cardiotrophin-1, annexin V, titin and type I collagen expression were associated with higher sensitivity of mitochondrial pore to  $\text{Ca}^{2+}$  in myocardium of spontaneous hypertensive rats with diabetes.

Key words: cardiotrophin-1, annexin V, titin, type I collagen, mitochondrial pore, myocardium, rats, hypertension, diabetes mellitus.

*Zaporizhzhya State Medical University*

#### **REFERENCES**

1. ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC).

2. Eur Heart J. 2013; 34: 2159-219.
2. Colosia A, Palencia R, Khan S. Prevalence of hypertension and obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in observational studies: a systematic literature review. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2013; 6: 327-38.
3. Cheung B, Li C. Diabetes and hypertension: is there a common metabolic pathway? *Curr Atheroscler Rep*. 2012; 14: 160-6.
4. Okoduwa S, Umar A, Ibrahim S, Bello F. Relationship of oxidative stress with type 2 diabetes and hypertension. *J Diabetology*. 2013; 1: 1-10.
5. Savoia C, Schiffrin E. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci (Lond)*. 2007; 112(7): 375-84.
6. Van Buren P, Toto R. The pathogenesis and management of hypertension in diabetic kidney disease. *Med Clin North Am*. 2013; 97(1): 31-51.
7. Izzo R, Simone G, Trimarco V, Gerds E, Giudice R, Vaccaro O et al. Hypertensive target organ damage predicts incident diabetes mellitus. *Eur Heart J*. 2013; 34 (44): 3419-26.
8. Russo C, Jin Z, Homma S, Rundek T, Elkind M, Sacco R et al. Effect of diabetes and hypertension on left ventricular diastolic function in a high-risk population without evidence of heart disease. *Eur J Heart Fail*. 2010; 12 (5): 454-61.
9. Wachtera R, Lüersa C, Kletaa S, Griebela K, Herrmann-Lingenb C, Binderc L. et al. Impact of diabetes on left ventricular diastolic function in patients with arterial hypertension. *Eur J Heart Fail*. 2007; 9 (5): 469-76.
10. Gonzalez A, Lopez B, Ravassa S, Beaumont J, Arias T, Hermida N. Biochemical markers of myocardial remodeling in hypertensive heart disease. *Cardiovas Res*. 2009; 81: 509-18.
11. Androulakis E, Tousoulis D, Papageorgiou N, Latsios G, Siasos G, Stefanadis C. The role of matrix metalloproteinases in essential hypertension. *Curr Top Med Chem*. 2012; 12(10):1149-58.
12. Lopez N, Diez J, Fortuno M. Characterization of the protective effects of cardiotrophin-1 against non-ischemic death stimuli in adult cardiomyocytes. *Cytokine*. 2005; 30 (5): 282-92.
13. Marchesi C, Dentali F, Nicolini E, Maresca A, Tayebjee M, Franz M. Plasma levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*. 2012; 30(1): 3-16.
14. Stakos D, Tziakas D, Chalikias G, Mitrousi K, Tsigalou C, Boudoulas H. Associations between collagen synthesis and degradation and aortic function in arterial hypertension. *Am J Hypertens*. 2010; 23(5): 488-94.
15. Hamdani N, Paulus W. Myocardial titin and collagen in cardiac diastolic dysfunction: partners in crime. *Circulation*. 2013; 128: 5-8.
16. Calabrò P, Limongelli G, Riegler L. Novel insights into the role of cardiotrophin-1 in cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol*. 2009; 46(2): 142-8.



17. Jougasaki M. Cardiotrophin-1 in cardiovascular regulation. *Adv Clin Chem.* 2010; 52: 41-76.
18. Kim J, Wei Y, Sowers J. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res.* 2008; 102: 401-14.
19. Puddu P, Puddu G, Cravero E, Pascalis S, Muscari A. The putative role of mitochondrial dysfunction in hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2007; 29 (7): 427-34.
20. Postnov YV. [Insufficient ATP generation due to mitochondria calcium overload as a source of blood pressure elevation in primary hypertension]. *Kardiologiya.* 2005;10: 4-11. Russian.
21. Liang M. Hypertension as a mitochondrial and metabolic disease. *Kidney Int.* 2011; 80: 15-16.
22. Gustafsson A, Gottlieb R. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovascular Research.* 2008; 77: 334-43.
23. Akopova OV, Sagach VF. [Induction of the mitochondrial pore opening as affected by  $Ca^{2+}$  in the rat myocardium]. *Ukr Biochem J.* 2004; 76(1): 48-55. Ukrainian.
24. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens.* 2003; 21(1): 3-12.
25. Asbun J, Villarreal F. The pathogenesis of myocardial fibrosis in the setting of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 693-700.
26. Shamhart P, Luther D, Adapala R, Bryant J, Petersen K, Meszaros J. Hyperglycemia enhances function and differentiation of adult rat cardiac fibroblasts. *Can J Physiol and Pharmacol.* 2013; 10: 84-90.
27. Ge M, Ma S, Tao L. The effect of gypenosides on cardiac function and expression of cytoskeletal genes of myocardium in diabetic cardiomyopathy rats. *Am J Chin Med.* 2009; 37(6): 1059-68.
28. Makarenko I, Opitz C, Leake M, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey J. et al. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res.* 2004; 95: 708-16.
29. Warren C, Jordan M, Roos K, Krzesinski P, Greaser M. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovasc Res.* 2003; 59 (1): 86-94.
30. Chung C, Hutchinson K, Methawasin M, Saripalli C, Smith J, Hidalgo C et al. Shortening of the elastic tandem immunoglobulin segment of titin leads to diastolic dysfunction. *Circul.* 2013; 128: 19-28.
31. Pemberton C, Raudsepp S, Yandle T, Cameron V, Richards A. Plasma cardiotrophin-1 is elevated in human hypertension and stimulated by ventricular stretch. *Cardiovasc Res.* 2005; 68: 109-17.
32. Ravassa S, Fortuño M, González A, López B, Zalba G, Fortuño A et al. Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2000; 36: 1065-71.
33. Kolesnyk MY, Belenichev IF, Dzyak GV, Checkman IS. [The peculiarities of mitochondria functioning in myocardium of spontaneous hypertensive rats with experimental diabetes and atherosclerosis]. *Zaporozhnye Medical Journal.* 2012; 2: 26-31. Russian.
34. Kolesnyk MY. [The abnormalities in nitric oxide system in cardiomyocytes of spontaneous hypertensive rats with experimental hyperglycemia and atherosclerosis]. *Tavricheskiy Mediko-Biol Vestnik.* 2012; 15(3): 154-58. Russian.
35. Kovalenko VN, Talaeva TV, Shumakov VA, Bratus VV. [Arterial hypertension and systemic metabolic disturbances in the pathogenesis of essential hypertension]. *Ukr NAMS Journal.* 2012;18: 40-54. Russian.
36. Cavanagh E, Ferder M, Inserra F, Ferder L. Angiotensin II, mitochondria, cytoskeletal, and extracellular matrix connections: an integrating viewpoint. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 296: 550-58.
37. Yudi P, Yvette P, Tamara C, John P, Lijnen J. Role of reactive oxygen species in the TGF-beta1-induced collagen production and differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts [abstract]. *J Clin Hypertension.* 2013; 15: 177.
38. Coletta D, Mandarino L. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance from the outside in: extracellular matrix, the cytoskeleton, and mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol. Metab.* 2011; 301: 749-55.
39. Azova MM, Blagonravov ML, Demurov EA, Frolov VA. [Energy deficit as a possible factor for the induction of caspase-dependent apoptosis in left ventricular myocardial cells during genetically determined and secondary arterial hypertension]. *Bull Exp Biology and Medicine.* 2012; 153 (6): 800-2. Russian.
40. Strutynskyi RB, Nagibin VS, Strutynska NA, Ianchii OR, Moibenko AA. [Influence of focalin on development of apoptosis and necrosis at anoxia-reoxygenation of culture rats neonatal cardiomyocytes] *Fiziol Z.* 2013; 59(3): 3-9. Ukrainian.
41. Lakomkin VL, Abramov AA, Kapelko VI. [Mitochondrial antioxidant SKQ1 decreases intensity of ventricular arrhythmias caused by epinephrine]. *Kardiologiya.* 2011; 11: 60-3. Russian.
42. Strutynska NA, Dorofeyeva N, Vavilova GL, Sagach VF. [Hydrogen sulfide inhibits  $Ca^{2+}$ -induced mitochondrial permeability transition pore opening in spontaneously hypertensive rats]. *Fiziol Z.* 2013; 59 (1): 3-10. Ukrainian.
43. Pisarenko OI, Serebryakova LI, Tskitishvili OV, Studneva IM, Vanin AF. [Myocardial infarction remodelling in rats with dinitrosyl iron complex with glutathione]. *Regional Circ and Microcirc.* 2008; 7 (2): 46-47. Russian.