

Вивчення впливу ω -3 поліненасичених жирних кислот на розподіл, локалізацію та експресію білка коннексину 43 в серці при цукровому діабеті

А.С. ЖУКОВСЬКА¹, А.М. ШИШ¹, О.О. МОЙБЕНКО¹, Т. БЕНОВА², Н. ТРИБУЛОВА², П. ВАЙСМАН²

¹Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ;

²Інститут серця Словацької академії наук, Братислава/

Резюме

Изучение влияния ω -3 полиненасыщенных жирных кислот на распределение, локализацию и экспрессию белка коннексина 43 в сердце при сахарном диабете

А.С. Жуковская, А.М. Шиш, А.А. Мойбенко, Т. Бенова, Н. Трибулова, П. Вайсман

В статье приведены результаты исследования по изучению влияния ω -3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) на распределение, локализацию и экспрессию белка коннексина 43 в сердце при сахарном диабете (СД). Выявлено, что применение этих кислот нормализует нарушенные при экспериментальном СД структуру, распределение, изменения иммунофлуоресцентного сигнала и экспрессии Cx-43. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что ω -3 ПНЖК, модулируя экспрессию Cx-43, могут улучшать межклеточное взаимодействие в сердце, снижать риск возникновения аритмий при СД.

Ключевые слова: сердце, ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты, сахарный диабет, коннексин 43

Summary

Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Influence on the Protein Connexin 43 Distribution, Localization and Expression in the Heart During Diabetes

A. Zhukovska, A. Shysh, A. Moibenko, T. Benova, N. Tribulova, P. Weissman

According revealed results omega-3 PUFAs restores impaired in experimental diabetes structure, distribution and expression of immunofluorescent signal Cx-43 and may enhance intercellular communication in the heart. This data can be used in arrhythmia protection during streptozotocin-induced diabetes.

Key words: heart, omega-3 polyunsaturated fatty acids, diabetes, connexin-43

За даними ВООЗ цукровий діабет (ЦД) – це епідемія неінфекційного походження. Відомо, що у хворих на ЦД значно збільшений ризик розвитку серцево-судинної патології та смертності від неї. Існують дані [14, 19] щодо порушення електричного зв'язку між кардіоміоцитами при зміні просторового розподілу, експресії чи фосфорилювання коннексину 43 (Cx-43) в міокарді, що може бути патогенетичною ланкою в розвитку порушень провідності серця при ЦД. Результати деяких досліджень свідчать про зниження числа каналів щільних контактів (ЩК) та кількості імунореактивних частинок Cx-43 в серці при цій патології. Можливо, ці зміни відбуваються внаслідок підвищення протеолітичної деградації в Cx-43 [11]. Проте інші виявили підвищення експресії цього білка, що не завжди пов'язано з покращенням міжклітинного зв'язку в серці при ЦД [10].

Міжклітинні ЩК є однією з форм міжклітинної взаємодії та ключовим структурно-функціональним фактором підтримання метаболічного гомеостазу в органах і тканинах. Головним білком цих ЩК є коннексин, який забезпечує міжклітинний зв'язок кардіоміоцитів, допомагає розповсюдженню електричного сигналу, синхронізує діяльність клітин та бере участь у внутрішньоклітинних шляхах передачі сигналу. Функціонування серця за фізіологічних умов істотно залежить від стану каналів, з яких утворені ЩК, розташованих здебільшого в ділянці вставних дисків, їх числа або ймовірності бути відкритими [10]. У міокарді дорослих тварин

коннексини переважно локалізовані у сарколемі, де шість Cx утворюють коннексон – геміканал ЩК. Показано, що білок Cx-43 найбільше експресується у міокарді, проте нещодавно було виявлено його локалізацію і у внутрішній мембрані мітохондрій та в ядрі кардіоміоцитів, де він відіграє роль кардіопротектора при ішемічному прекодиційованні (ІП), може змінювати синтез ДНК, ріст та диференціювання клітин. Схоже, що структурна перебудова міокарда при патології серцево-судинної системи пов'язана з ремоделюванням внутрішньоклітинних ЩК, яке сприяє розвитку ішемічних пошкоджень міокарда та аритмій [16].

Серцево-судинні захворювання є головною причиною смерті пацієнтів з ЦД, але механізми, за рахунок яких розвивається порушення функції серця, розкриті лише частково. Так, порушення ритму та провідності серця при ЦД можуть виникати внаслідок розвитку ішемічної хвороби серця, артеріальної гіпертензії тощо. Протягом тривалого часу в ролі кардіопротекторів виступають ω -3 поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), які запобігають розвитку захворювань серцево-судинної системи [2]. Проте на даний час все ще не розкриті мембранні механізми дії ω -3 ПНЖК та їх роль за умов метаболічних порушень серця при ЦД.

Метою даної роботи стало дослідження впливу ω -3 ПНЖК на розподіл, локалізацію та експресію білка Cx-43 в структурі серця при моделюванні експериментального інсулінозалежного ЦД.

Робота виконана при консультативній підтримці завідуючої відділом цитології Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, професора Г.Г. Скібо.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 140–250 г, віком 3 місяці. Експериментальний ЦД моделювали одноразовим введенням стрептозотоцину («Sigma», США) [8]. Препарат розводили 0,1-молярним цитратним буфером (рН 4,5) і вводили тваринам внутрішньоочередово із розрахунку 50 мг/кг маси тіла з дотриманням умов роботи з лабораторними тваринами. Розвиток гіперглікемії вимірювали за допомогою стандартного набору (Accu-Chek Active, Roche, Німеччина). Дослідження проводили на тваринах, рівень глюкози крові яких перевищував 14 ммоль/л. У роботі використовували 3 групи тварин: I – контрольні щури (n=5), II – щури з ЦД (n=5), III – щури, яким після підтвердження ЦД давали препарат, що містить ефіри ω -3 ПНЖК, протягом 4 тижнів в дозі 0,1 мг/100 г маси тіла (n=5). До складу препарату входять ω -3 ПНЖК тваринного походження (суміш ейкозапентаєнової та докозагексаєнової кислот з риб'ячого жиру). Через 5 тижнів після введення стрептозотоцину тварин зважували і проводили декапітацію. Після декапітації швидко вилучали серце, вміщували його у льодяний 0,9% розчин KCl до повної зупинки. Тканину лівого шлуночка (ЛШ) тварин трьох груп швидко заморожували у рідкому азоті.

А) Непряма імунофлуоресценція була виконана на серії поперечних зрізів незафіксованої тканини ЛШ, товщиною 10 мкм. Фіксацію проводили у 4% розчині параформальдегіду тричі по 5 хвилин. Зрізи інкубували з первинними моноклональними мишачими анти-Sx-43 антитілами (1:100, Chemicon Int., USA) протягом 1,5 годин за кімнатної температури. Після промивання зрізів 3 рази по 5 хвилин у розчині натрій-фосфатного буферу (НФБ) використовували вторинні FITC-кон'юговані козячі анти-мишачі антитіла (1:100, Chemicon Int., USA) та інкубували зрізи 1,5 години у темряві. З метою контролю частину зрізів інкубували з вторинними антитілами без застосування первинних. Після відмивання у НФБ зрізи фіксували у середовищі для фіксації Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, USA) і досліджували за допомогою флуоресцентного мікроскопа AxioStar fluorescent microscope (Carl Zeiss, Germany) при використанні об'єктива $\times 40$. Аналіз зображень здійснювали за допомогою програмного забезпечення Soft Imaging System (GmbH, Germany) на підставі замірів по всій площі зрізу тканини ЛШ. На кожному зрізі кількісно оцінювали 16 випадково обраних ділянок. На кожній обраній ділянці вивчали площу та інтенсивність свічення імунофлуоресцентного забарвлення Sx-43 напівкількісним методом [4].

Б) Заморожену тканину ЛШ гомогенізували, розтираючи у ступці з додаванням рідкого азоту, і проводили її лізис у розчині Solution buffer 20 (20% SDS, 10 ммоль/л EDTA, 0,1 моль/л TRIS, рН 6,8). Пробу піддавали ультразвуковій гомогенізації протягом 30 сек. Загальну концентрацію білка визначали за методом Bradford. Електрофорез білків проводили за Laemmli із застосуванням 10% розділяючого та 5% концентруючого поліакриламідного гелю [9]. Кількість білків, нанесених на кожен доріжку гелю, нормували за рівнем конт-

рольного білка GAPDH у зразках тканин, що порівнювалися. Розділені білки переносили на нітроцелюлозну мембрану (Amersham, Germany) за допомогою електрофоретичного переносу білка з гелю на мембрану. З метою блокування неспецифічних зв'язків отримані реплікати блокували 5% розчином сухого знежиреного молока протягом години. Далі мембрану інкубували з моноклональними кролячими антитілами Sx-43 (1:4000, Sigma-Aldrich, USA) протягом 1,5 год при температурі 37°C при постійному перемішуванні та в розчині видоспецифічних антитіл IgG, мічених пероксидазою хрому (1:1000, Amersham, Germany). Кожен етап супроводжувався багаторазовим промиванням в НФБ з 0,05% Tween 20. Для проявки білкових локусів використовували систему детекції ECL. Кількісну оцінку білкових локусів (смуг) проводили з використанням комп'ютерної програми PCBAS 2.08e. Вміст дослідних білків в тканинах представлено в умовних одиницях, які розраховували як співвідношення кількості досліджуваного білка до кількості контрольного білка GAPDH на тій самій доріжці гелю.

Статистичну обробку проводили згідно з Державною фармакопеею України з використанням t-критерію Стьюдента та програми Origin (USA).

Результати та їх обговорення

Результати імунофлуоресцентного дослідження свідчать про порушення розподілу Sx-43 в міокарді ЛШ при ЦД (рис. 1, 2). Так, відмічався латеральний перерозподіл, розсіювання, поява поодиноких імунореактивних частинок Sx-43 у вставних дисках та на поверхні мембрани, порушення цілісності кардіоміоцитів у тканині серця (рис. 2Б), в той час як у нормі білок локалізується у вставних дисках (рис. 2А). Після індукції ЦД у щурів спостерігали підвищення середньої інтенсивності імунофлуоресцентного сигналу Sx-43 на 16,6% ($\times 40$) ($p < 0,05$) (рис. 1).

Таким чином, під впливом стрептозотоцину у міокарді тварин відбувається посилення інтенсивності імунофлуоресцентного сигналу та надмірний рівень експресії Sx-43. В роботі Lin H. et al. також було отримано подібні результати [10].

Гострі та хронічні захворювання різної етіології пов'язані зі змінами експресії Sx-43 і патологічним ремоделюванням ЩК, що може бути одним із ключових факторів індукції аритмії. Літературні дані свідчать про різноспрямовані зміни інтенсивності імунофлуоресцентного сигналу та експресування цього білка у ЩК при ЦД. Було встановлено, що фосфорилування Sx-43 є необхідною умовою для нормального функціонування каналів ЩК,

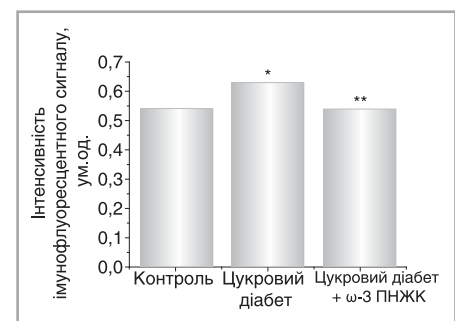


Рис. 1. Зміни інтенсивності імунофлуоресцентного сигналу Sx-43 в міокарді щурів при цукровому діабеті та за умов впливу ω -3 поліненасичених жирних кислот

Примітки: * – вірогідно порівняно з контролем, ** – вірогідно порівняно з цукровим діабетом; $p < 0,05$; ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти.

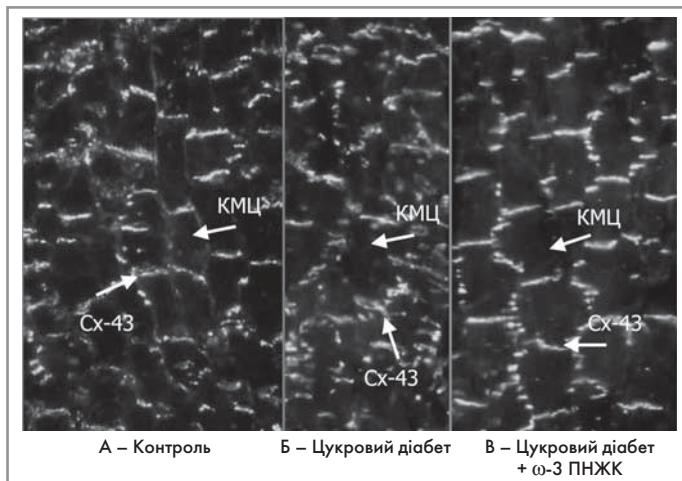


Рис. 2. Зміни інтенсивності імунофлуоресцентного сигналу Sx-43 в тканині лівого шлуночка щурів дослідних груп

Примітки: КМЦ – кардіоміоцит, Sx-43 – коннексин 43.

тоді як недостатнє або гіперфосфорильовання вказує на пошкодження міжклітинного електричного зв'язку, який забезпечується цими каналами [4]. Так, було зазначено про посилення експресії і підвищення імунофлуоресцентного сигналу Sx-43 у ЩК серця при ЦД одночасно з посиленням експресії РКСе. Одні дослідники вважають, що фосфорильовання Sx-43 протеїнкіназою С-епсилон знижує провідність і проникність каналу ЩК [10]. Хоча з іншого боку, запуск протеїнкіназного шляху захищає кардіоміоцити від індукованого гіперглікемією апоптозу клітин серця при ЦД [13]. Існують докази того, що фосфорильовання Sx-43 може викликати його інтерналізацію і деградацію. При ЦД за даними електронної мікроскопії змінюється ультраструктура ЩК: виявляється збільшення числа довгомірних периферичних, зв'язаних зі вставними дисками і латеральних ЩК, «кільцеві профілі» інтерналізованих ЩК в шлуночках сердець щурів з ЦД [10].

Незважаючи на зростання вмісту загального і фосфорильованого Sx-43, інша група дослідників не спостерігала достовірних змін експресії матричної РНК цього білка в серці за результатами полімеразної ланцюгової реакції при стрептозотоциніндукованому ЦД [7]. Тайванські дослідники вважають, що порушення розподілу і експресування Sx-43 пов'язано з активацією апоптозу, що підтверджено збільшенням кількості апоптотичних тілець у міокарді при ЦД [19]. Водночас, посилена регуляція і латералізація Sx-43 є важливими етапами негайної адаптивної реакції серця на збільшення обсягу роботи в умовах компенсованої гіпертрофії [13].

Проте в іншому дослідженні показано, що латералізація Sx-43 та зниження числа ЩК під впливом стрептозотоциніндукованого ЦД є однією з основних причин порушення резерву провідності в серці [12]. Можливо, довготривалість індукованого діабету відіграє значну роль у зміні експресії білка, тому описані дані не узгоджуються з нашими результатами.

Після попереднього застосування ω -3 ПНЖК на фоні ЦД в тканині серця відмічено нормалізацію розподілу та відновлення взаєморозташування субклітинних структур і експресії Sx-43 (рис. 2B). Також у міокарді щурів, які на фоні ЦД отримували ω -3 ПНЖК, спо-

стерігали відновлення інтенсивності забарвлення Sx-43 майже до контрольного рівня (рис. 2B), зокрема, зниження імунофлуоресцентного сигналу на 13,76% ($\times 40$) ($p < 0,05$) порівняно з групою ЦД. Отже, введення до раціону харчування ω -3 ПНЖК сприяє нормалізації інтенсивності імунофлуоресцентного сигналу та вмісту Sx-43 в міокарді щурів з ЦД.

Нині незаперечним є факт, що ω -3 ПНЖК впливають на основні елементи електричної активності серця – іонні канали, обмінники і модулятори, таким чином попереджуючи розвиток злоякісних аритмій, що було підтверджено і в клінічних дослідженнях [12]. За даними літератури антиаритмічний і кардіопротекторний вплив цих кислот, вірогідно, опосередкований регулюванням факторів транскрипції (SREBP, PPAR), модуляцією експресії генів, впливом на сигнальні молекули (NO, РКСе) і взаємодією з ДНК [4].

Розглянуті вище дані підтверджуються подібною тенденцією на рівні експресії мембранного білка Sx-43. В результаті наших досліджень виявлено різний ступінь експресування цього білка в міокарді щурів експериментальних груп. За умов експериментального ЦД рівень експресії Sx-43 збільшується на 68,27% ($P < 0,05$) порівняно з контролем.

Ймовірно, експресія білка підвищується за рахунок нефосфорильованої форми, що пов'язано з латеральним розподілом білка в каналах. Так, наведені вище дані імунофлуоресцентного аналізу свідчать, що в клітинах серця при ЦД істотно порушується розподіл, експресія імунореактивних частинок Sx-43 у вставних дисках, відмічається їх розсіювання, що може вказувати на порушення функціонування каналу ЩК. Застосування ω -3 ПНЖК за цих умов зменшує рівень експресії Sx-43 на 20% ($p < 0,05$) порівняно з II групою тварин (рис. 3). На думку авторів, ω -3 ПНЖК сприяють відновленню фосфорильованої форми білка, що відіграє суттєву роль у функціонуванні каналів.

Вищевикладене може свідчити про те, що ω -3 ПНЖК модулюють експресію білка Sx-43 при експериментальному ЦД.

В роботі канадських вчених не відмічено суттєвих змін співвідношення фосфорильованої і нефосфорильованої форм Sx-43 при нижчому рівні його експресії, тому з'ясування механізмів цього пригнічення, індукованого ω -3 ПНЖК, потребує подальших досліджень [18]. Сучасними дослідниками було показано, що Sx-43

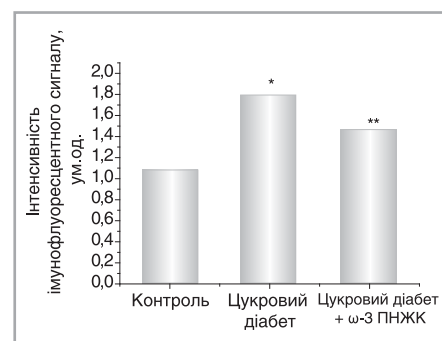


Рис. 3. Експресія білка Sx-43 в тканині лівого шлуночка серця контрольних щурів при цукровому діабеті та за умови впливу ω -3 поліненасичених жирних кислот

Примітки: * – вірогідно порівняно з контролем, ** – вірогідно порівняно з цукровим діабетом; $p < 0,05$.

відіграє важливу роль у кардіопротекції при ішемічному прекодиціонуванні, адже він локалізований і в мітохондріях. Зокрема, вважається, що протекторний вплив мітохондріального Sx-43 опосередкований стимулюванням мітохондріальних mitoK^+ATP -каналів [16]. За даними М. Engler та співав-

торів [6], додавання до раціону ейкозапентаєнової кислоти (з родини ω -3) може активувати K^+ АТФ-канали. Більше того, кардіопротекцію, пов'язану з ω -3 ПНЖК, нещодавно було визначено як «дієтичне прекодиціювання» серця [3]. У досліджах з ω -3 ПНЖК на фоні ішемії-реперфузії серця виявлено зниження споживання кисню міокардом, що може свідчити про наявність метаболічного резерву, який сприяє зниженню чутливості серця до аритмій, забезпечуючи енергію для підтримання трансмембранних потенціалів [15]. Раніше авторами було показано [1], що при стрептозотозиндукованому ЦД на фоні отримання тваринами ω -3 ПНЖК відновлюються знижені показники АДФ-стимульованого споживання кисню міокардом, а з сучасних літературних джерел відомо про кореляцію між вмістом Сх-43 і АДФ-стимульованим диханням у мітохондріях серця щурів [5].

Таким чином, спираючись на дані літератури та власні експериментальні дослідження, можна стверджувати, що ω -3 ПНЖК мають комплексний вплив на структурні та функціональні параметри серця при ЦД. Отримані результати можуть бути корисними для розуміння патогенезу розвитку ішемічної хвороби серця при інсулінозалежному ЦД. Адже відомо, що з 80% смертей від серцево-судинних захворювань більшість припадає на пацієнтів з ЦД [17].

Висновки

1. За результатами імунофлуоресцентного аналізу при ЦД спостерігається порушення розподілу, дезорганізація і латералізація Сх-43, збільшення числа його імунореактивних частинок у вставних дисках тканини серця порівняно з контролем.
2. Застосування ω -3 ПНЖК нормалізує розподіл, зміни імунофлуоресцентного сигналу і експресії Сх-43 при експериментальному ЦД, а число імунореактивних частинок в міокарді ЛШ щурів відновлюється до контрольних значень.
3. Доведено, що ω -3 ПНЖК модулюють експресію Сх-43 в серці за умов ЦД, тим самим поліпшуючи міжклітинну взаємодію, що може сприяти зниженню ризику серцево-судинних ускладнень за цієї патології.

Література

1. Жуковська А.С., Шиш А.М., Мойбенко О.О. Дослідження впливу ω -3 поліненасичених жирних кислот на жирнокислотний склад серця, дихання та набухання мітохондрій серця при експериментальному цукровому діабеті // Фізіол. журн. – 2012. – №2. – С. 16–26.
2. Шиш А.М., Мойбенко А.А., Французова С.Б. Кардіопротекторний ефект омега-3 поліненасичених жирних кислот при ішемическом и реперфузионном повреждении миокарда // Вісник фармакології та фармації. – 2008. – №9. – С. 36–42.
3. Abdukeyum G.G., Owen A.J., McLennan P.L. Dietary (n-3) Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit Ischemia and Reperfusion Arrhythmias and Infarction in Rat Heart Not Enhanced by Ischemic Preconditioning // J. Nutr. – 2008. – Vol. 138. – P. 1902–1909.
4. Bacova B., Radosinska J., Knezl V. et al. Omega-3 fatty acids and atorvastatin suppress ventricular fibrillation inducibility in hypertriglyceridemic rat hearts: implication of intracellular coupling protein, connexin-43 // J. Physiol. Pharmacol. – 2010. – Vol. 61 (6). – P. 717–723.
5. Boengler K., Ruiz-Meana M., Gent S. et al. Mitochondrial connexin 43 impacts on respiratory complex I activity and mitochondrial oxygen consumption // J. Cell Mol. Med. – 2012. – Vol. 16 (8). – P. 1649–1655.
6. Engler M.B., Engler M.M., Browne A. et al. Mechanisms of vasorelaxation induced by eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in WKY rat aorta // Br. J. Pharmacol. – 2000. – Vol. 131, №8. – P. 1793–1799.
7. Howarth F.C., Chandler N. J., Kharache S. et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes on connexin43 mRNA and protein expression in ventricular muscle // Mol. Cell Biochem. – 2008. – Vol. 319 (1–2). – P. 105–114.
8. Kanter M., Sen S, Donmez S. et al. Protective effects of irbesartan and alpha lipoic acid in STZ-induced diabetic nephropathy in rats // Ren. Fail. – 2010. – Vol. 32 (4). – P. 498–505.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
10. Lin H., Mitasikova M., Dlugosova K. et al. Thyroid hormones suppress epsilon-PKC signalling, down-regulate connexin-43 and increase lethal arrhythmia susceptibility in non-diabetic and diabetic rat hearts // J. Physiol. Pharmacol. – 2008. – Vol. 59 (2). – P. 271–285.
11. Lin H., Ogawa K., Imanaga I., Tribulova N. Remodeling of connexin 43 in the diabetic rat heart // Mol. Cell Biochem. – 2006. – Vol. 290. – P. 69–78.
12. London B., Albert C., Anderson M.E. et al. Omega-3 fatty acids and cardiac arrhythmias: prior studies and recommendations for future research (report) // Circulation. – 2007. – Vol. 116 (10). – P. 320–335.
13. Malhotra A., Begley R., Kang B.P. et al. PKC-epsilon-dependent survival signals in diabetic hearts // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2005. – Vol. 289, №4. – P. 1343–1350.
14. Nygren A., Olson M. L., Chen K. Y. et al. Propagation of the cardiac impulse in the diabetic rat heart: reduced conduction reserve // J. Physiol. – 2007. – Vol. 580, №15. – P. 543–560.
15. Pepe S., McLennan P.L. Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and postischemic recovery of contractile function // Circulation. – 2002. – Vol. 105. – P. 2303–2308.
16. Rodriguez-Sinovas A., Sanchez J. A., Fernandez-Sanz C. et al. Connexin and pannexin as modulators of myocardial injury // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – Vol. 1818 (8). – P. 1962–1970.
17. Ruiz-Meana M., Rodriguez-Sinovas A., Cabestrero A. et al. Mitochondrial connexin43 as a new player in the pathophysiology of myocardial ischaemia-reperfusion injury // Cardiovasc Res. – 2008. – Vol. 77. – P. 325–333.
18. Sarrazin J.-F., Comeau G., Daleau P. et al. Reduced Incidence of Vagally Induced Atrial Fibrillation and Expression Levels of Connexins by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Dogs // J. Am. Coll. Cardiol. – 2007. – Vol. 50. – P. 1505–1512.
19. Sheu J.-J., Chang L.-T., Chiang C.-H. et al. Impact of Diabetes on Cardiomyocyte Apoptosis and Connexin43 Gap Junction Integrity. Role of Pharmacological Modulation // Int. Heart J. – 2007. – Vol. 48. – P. 233–245.