

© Коллектив авторов, 2018
УДК 612.176.2

Афанасьев С.А., Егорова М.В., Куцыкова Т.В., Попов С.В.

Влияние свободных жирных кислот на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами крыс при ишемическом или диабетическом поражении сердца

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634012, Томск, Россия, ул. Киевская, д. 111А

Цель исследования — оценка влияния свободных полиненасыщенных и насыщенных жирных кислот (ЖК) на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами интактных крыс и крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца. **Методика.** Опыты проведены на крысах-самцах Вистар (250—300 г). Инфаркт миокарда вызывали перевязкой левой коронарной артерии, сахарный диабет (СД) — однократной инъекцией стрептозотоцина в дозе 60 мг/кг, внутривенно. Изолированные кардиомиоциты получали ферментативным способом. Потребление кислорода оценивали полярографически при разной насыщенности инкубационной среды кислородом ($[O_2] \leq 8$ мг/л и $[O_2] \geq 16$ мг/л). В качестве жирных кислот, добавляемых в инкубационную среду, использовали арахидоновую и пальмитиновую кислоты (20 мкМ/л). **Результаты.** Установлено, что в среде инкубации с высоким содержанием кислорода скорость его потребления изолированными кардиомиоцитами, из сердец крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца, в 2—2,5 раза превышает таковую в кардиомиоцитах из сердца интактных крыс. Введение в среду инкубации 20 мкМ арахидоновой или пальмитиновой ЖК статистически значимо увеличивало потребление кислорода кардиомиоцитами интактных крыс. При моделируемых патологиях был получен прямо противоположный результат. В среде инкубации с низким содержанием кислорода была зафиксирована более низкая исходная скорость дыхания кардиомиоцитов, независимо от того, из сердец крыс какой группы они были выделены. Присутствие жирных кислот приводило к еще большему снижению скорости потребления кислорода кардиомиоцитами интактных крыс. В кардиомиоцитах из сердец с ишемическим поражением жирные кислоты снижали скорость потребления кислорода практически до значений, полученных для кардиомиоцитов интактных крыс. Напротив, жирные кислоты не оказывали заметного влияния на дыхание кардиомиоцитов из сердца крыс с диабетическим поражением. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что и насыщенные, и ненасыщенные свободные ЖК, на клеточном уровне, способны поддерживать баланс между поступлением и расходом кислорода. Действие ЖК определяется функциональным состоянием кардиомиоцитов и содержанием кислорода во внеклеточном пространстве. Это обстоятельство, вероятно, влияет на состояние энергетического метаболизма кардиомиоцитов и при реальном ишемическом или диабетическом поражении сердца пациентов.

Ключевые слова: кардиомиоциты; стрептозотоциновый диабет; жирные кислоты; постинфарктный кардиосклероз.

Для цитирования: Афанасьев С.А., Егорова М.В., Куцыкова Т.В., Попов С.В. Влияние свободных жирных кислот на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами крыс при ишемическом или диабетическом поражении сердца. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 22—26.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.22-26

Для корреспонденции: Афанасьев Сергей Александрович, доктор мед. наук, зав. лаб. молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, e-mail: Tursky@cardio-tomsk.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы статьи подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Поступила 28.09.2017

Afanas`ev S.A., Egorova M.V., Kutsykova T.V., Popov S.V.

Effect of free fatty acids on oxygen consumption by isolated rat cardiomyocytes in ischemic or diabetic heart disease

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 111/a Kievskaya Str., Tomsk 634012, Russia

Aim. To evaluate the effect of free polyunsaturated and saturated fatty acids on oxygen uptake by isolated cardiomyocytes in intact rats and animals with ischemic or diabetic heart disease. **Methods.** This was a non-randomized, controlled study on three groups of male Wistar rats each containing 10 rats weighing 250—300 g. Myocardial infarction («heart attack») was produced by ligation of the left coronary artery; diabetes mellitus («diabetes») — by a single injection

of streptozotocin 60 mg/kg, i.p. The control group consisted of intact animals. Cardiomyocytes were isolated by an enzymatic method. Oxygen consumption was assessed polarographically at different saturation of the incubation medium with oxygen ($[O_2] \leq 8$ mg/l and $[O_2] \geq 16$ mg/l). Arachidonic and palmitic acid were used as fatty acids to be added to the incubation medium. **Results.** In the high-oxygen incubation medium, the rate of O_2 consumption by isolated cardiomyocytes from hearts of rats with ischemic or diabetic heart lesions was 2—2.5 times higher than in cardiomyocytes from heart of intact rats. Supplementing the incubation medium with 20 μ M arachidonic or palmitic acid statistically significantly increased oxygen consumption by cardiomyocytes of intact rats. An opposite result was obtained in models of diseases. In the low-oxygen incubation medium, the baseline rate of cardiomyocyte respiration was lower, no matter from which group of rats they had been isolated. The presence of fatty acids led to an even greater decrease in the rate of oxygen consumption by cardiomyocytes of intact rats. In cardiomyocytes from hearts with ischemic injury, fatty acids reduced the rate of oxygen consumption practically to the values observed for cardiomyocytes of intact rats. In contrast, fatty acids did not exert a noticeable effect on respiration of cardiomyocytes from the heart rats with diabetic lesions. **Conclusion.** The results suggested that saturated and unsaturated free fatty acids are able to maintain a balance between O_2 supply and utilization. The effect of fatty acids is determined by functional state of cardiomyocytes and oxygen content in the extracellular space. This fact apparently influences cardiomyocyte energy metabolism in patients with ischemic or diabetic heart disease.

Keywords: cardiomyocytes, fatty acids, streptozotocin-induced diabetes, myocardial infarction.

For citation: Afanas`ev S.A., Egorova M.V., Kutsykova T.V., Popov S.V. Influence of free fatty acids on oxygen consumption by isolated rat cardiomyocytes in ischemic or diabetic heart disease. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 22—26. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.22-26

For correspondence: Afanas`ev Sergey A., Doctor med., Head Laboratory of Molecular Cell Pathology and Genetic Diagnosis, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia; 634012, 111/a, Kievskaya str., Tomsk city, Russian Federation, e-mail: Tursky@cardio-tomck.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Afanasiev S.A., <http://orcid.org/0000-0001-6066-3998>

Egorova M.V., <http://orcid.org/0000-0003-0301-3547>

Popov S.V., <http://orcid.org/0000-0002-9050-4493>

Received 28.09.2017

Введение

Хорошо известно, что одним из факторов, приводящих к нарушению функциональной состоятельности миокарда, является несоответствие между увеличением потребности миокарда в кислороде и нарастанием кислородного и энергетического дефицита. Этот фактор имеет место при формировании сердечной недостаточности ишемического генеза и развитии «метаболической ишемии» миокарда при сахарном диабете [1]. Возникновение такого дисбаланса связывают с тем, что жирные кислоты ингибируют окисление глюкозы в кардиомиоцитах [1—3]. Среди результатов экспериментальных и клинических исследований нередко можно встретить противоречивые данные об интенсивности процессов окисления жирных кислот в кардиомиоцитах и, соответственно, о «кислородном запросе» миокарда [1, 4], что связано с получением данных на разных объектах и в разных условиях. Одной из проблем при работе является невозможность воспроизведения условий естественной оксигенации и ее регуляции, обусловленной поступлением кислорода из крови и изменением коронарного кровотока.

В последние годы была доказана высокая значимость длинноцепочечных жирных кислот в поддержании и регуляции функциональной активности патологического миокарда [5—7]. Эти работы вновь актуализируют вопрос о взаимосвязи окисления жирных кислот в кардиомиоцитах и росте «кислородного запроса» миокарда.

Цель исследования — оценка влияния свободных полиненасыщенных и насыщенных жирных кислот (ЖК) на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами интактных крыс и крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца.

Методика

Выполнено нерандомизированное контролируемое исследование. В работе использовано 3 группы крыс-самцов Вистар (масса 250—300 г), группа «контроль» (интактные крысы $n = 10$), группа «инфаркт» ($n = 10$) и группа «диабет» ($n = 10$). Крысы имели свободный доступ к воде и пище, и содержались в стандартных условиях вивария.

Инфаркт миокарда воспроизводили у крыс перевязкой левой передней нисходящей коронарной артерии [8, 9], сахарный диабет — однократной инъекцией стрептозотоцина («Sigma», США) в дозе 60 мг/кг, внутривенно [10]. Через 6 нед. после перевязки коронарной артерии у крыс формировался постинфарктный кардиосклероз, а инъекция стрептозотоцина приводила к развитию сахарного диабета I типа. Диабет верифицировали по увеличению в крови крыс концентрации глюкозы (в 3—4,5 раза), снижению массы тела, развитию полиурии и полидипсии. Работу с животными проводили в соответствии с этическими требованиями, предъявляемыми к работе с экспериментальными животными (Федеральный закон «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. и приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики»).

Для получения изолированных кардиомиоцитов применяли метод ферментативного разделения миокарда взрослой крысы собственной модификации [11, 12]. Скорость потребления кислорода кардиомиоцитами определяли полярографически, используя электрод Кларка [12, 13]. Инкубацию кардиомиоцитов проводили в растворе Krebs—Хенселяйта с добавлением 2 мМ CaCl₂. Измерения выполняли в термостабилизированной но не газоизолированной ячейке при температуре раствора 37°C и рН 7,4 в условиях постоянного перемешивания магнитной мешалкой. Концентрация белка в пробе определяли методом Лоури.

Все измерения проводили в течение 1-го часа после получения суспензии изолированных кардиомиоцитов. Учитывая высокую чувствительность кардиомиоцитов к кислороду, инкубацию осуществляли в средах с низким (6—8 мг/л) и с высоким (16—20 мг/л) содержанием кислорода, обозначенных как [O₂] ≤ 8 мг/л и [O₂] ≥ 16 мг/л соответственно. Для насыщения среды инкубации кислородом использовали газовую смесь карбоген (O₂ — 95%, CO₂ — 5%). В качестве полиненасыщенной и насыщенной жирных кислот использовали, соответствен-

но, арахидоновую и пальмитиновую кислоты («Sigma», США) которые добавляли в среду инкубации в концентрации 20 мкМ/л. Скорость потребления кислорода выражали как нМ O₂ в минуту на 1 мг белка.

Размер выборки предварительно не рассчитывался, а величины показателей представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили по критерию Шапиро—Вилка. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках гипотезу о равенстве средних выборочных величин проверяли, используя t-критерий Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Ни одна из крыс опытных групп после перевязки коронарной артерии или инъекции стрептозотоцина не погибла и, по прошествии шести недель, все животные были взяты в следующий этап исследования. Согласно данным представленным в табл. 1, исходная скорость потребления кислорода изолированными кардиомиоцитами, полученными из сердец крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца, в 2—2,5 раза превышает таковую в кардиомиоцитах из сердца интактных крыс.

Введение в среду инкубации клеток свободных жирных кислот, как пальмитиновой, так и арахидоновой, приводило к статистически значимому (при использовании пальмитиновой кислоты почти на 32%) увеличению потребления кислорода кардиомиоцитами интактных крыс. Напротив, в группах «инфаркт» и «диабет» было отмечено не менее выраженное снижение скорости потребления кислорода.

При сопоставлении данных, представленных в табл. 1 и 2, видно, что в среде инкубации с низким содержанием кислорода была зафиксирована более низкая исходная скорость дыхания кардиомиоцитов независимо от того, из сердец крыс какой группы они

Таблица 1

Скорость поглощения кислорода (нМ в мин на мг белка) изолированными кардиомиоцитами при высокой концентрации кислорода ([O₂] ≥ 16 мг/л) в среде инкубации

Группы крыс	Условия инкубации		
	Без добавок	Пальмитиновая кислота, 20 мкМ /л	Арахидоновая кислота, 20 мкМ /л
Контроль	65,4 ± 3,0	86,2 ± 5,0#	85,0 ± 7,1#
"Инфаркт"	152,3 ± 8,5*	102,1 ± 6,5*#	125,3 ± 9,5*#
"Диабет"	164,3 ± 12,4*	128,3 ± 9,8*#	118,2 ± 6,5*#

Примечание. * — p < 0,05 в сравнении с соответствующим показателем в контрольной группе; # — p < 0,05 внутригрупповые сравнения

были выделены. Различия для групп «контроль», «диабет» и «инфаркт» составили 1,3, 1,7 и 1,9 раза соответственно. Введение в этих условиях в инкубационную среду пальмитиновой или арахидоновой кислоты приводило к еще большему снижению скорости потребления кислорода кардиомиоцитами интактных крыс. В группе «инфаркт» жирные кислоты снижали скорость потребления кислорода кардиомиоцитами практически до значений, полученных в контрольной группе (интактные крысы). Однако в группе «диабет» ни одна из использованных жирных кислот не оказывала заметного влияния на дыхание кардиомиоцитов (табл. 2).

Из полученных данных следует, что изменение интенсивности дыхания изолированных кардиомиоцитов в присутствии свободных жирных кислот может быть разнонаправленным. Наблюдаемый эффект зависит как от функционального состояния кардиомиоцитов, так и от содержания кислорода во внеклеточном пространстве. Оба эти фактора способны влиять на градиент O_2 , и, следовательно, скорость его диффузии в кардиомиоциты. Разное влияние жирных кислот на интенсивность потребления кислорода в кардиомиоцитах интактных крыс и крыс с ишемическим или диабетическим поражением миокарда, по всей видимости, объясняется разными метаболическими возможностями их митохондрий. В первую очередь, здесь имеет значение способность митохондрий утилизировать кислород и использовать жирные кислоты в качестве энергетического субстрата.

Полученные результаты согласуются с представлениями о метаболических сдвигах в миокарде в результате ишемии и сахарного диабета [3, 14, 15]. Насыщенные и ненасыщенные свободные жирные кислоты приводили к однонаправленным изменениям потребления кислорода кардиомиоцитами, выделенными из миокарда интактных крыс и крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца. Отсутствие различий в эффектах жирных кислот на дыхание кардиомиоцитов в рассматриваемых условиях позволяет предположить, что оно является проявлением неспе-

цифического действия жирных кислот на митохондриальные процессы, как это было показано нами ранее [13].

Выявленная разнонаправленность действия и кислород-зависимость влияния жирных кислот, как насыщенной, так и ненасыщенной, по-видимому, объясняется именно функциональным состоянием митохондрий, их способностью утилизировать кислород и использовать жирные кислоты в качестве энергетического субстрата. Традиционно считается, что жирные кислоты увеличивают кислородный запрос кардиомиоцитов, что, в свою очередь, должно увеличивать кислородный дефицит при ишемии миокарда [3, 14, 15]. Однако наши результаты не согласуются с этим. Напротив, судя по полученным данным, жирные кислоты поддерживают определенный баланс между поступлением кислорода и его расходом на уровне клетки.

Результаты нашей работы перекликаются с предположениями и выводами, сделанными другими исследователями [4, 6]. Так, авторы этих публикаций отмечают, что в здоровом организме стойкое повышение циркулирующих жирных кислот не является необходимым и потенциально способно привести к нарушению функциональной активности миокарда. Однако жирные кислоты необходимы для поддержания нормальной активности кардиомиоцитов при уже развившихся заболеваниях сердца. Одним из возможных механизмов обнаруженных эффектов экзогенных жирных кислот на дыхание кардиомиоцитов может быть их способность как увеличивать неспецифическую проницаемость мембран митохондрий, так и ингибировать эти процессы в патологическом миокарде.

Таким образом, результаты свидетельствуют о том, что как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты, на клеточном уровне, способны поддерживать баланс между поступлением кислорода и его расходом. Действие свободных жирных кислот на интенсивность дыхания изолированных кардиомиоцитов определяется как их функциональным состоянием, так и содержанием кислорода во внеклеточном пространстве. Это обстоятельство, вероятно, может определять

Таблица 2

Скорость поглощения кислорода (нМ в мин на мг белка) изолированными кардиомиоцитами при низкой концентрации кислорода ($[O_2] \leq 8$ мг/л) в среде инкубации

Группы крыс	Условия инкубации		
	Без добавок	Пальмитиновая кислота, 20 мкМ /л	Арахидоновая кислота, 20 мкМ /л
Контроль	49,5 ± 2,1	32,4 ± 3,0#	30,5 ± 4,1#
"Инфаркт"	81,3 ± 6,5*	49,3 ± 6,3*#	51,3 ± 5,5*#
"Диабет"	97,8 ± 4,0*	104,3 ± 8,8*	108,5 ± 10,0*

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с соответствующим показателем в контрольной группе; # — $p < 0,05$ внутригрупповые сравнения

состояние энергетического метаболизма кардиомиоцитов при реальном ишемическом или диабетическом поражении сердца пациентов. Одним из возможных механизмов обнаруженных эффектов экзогенных жирных кислот может быть их влияние на неспецифическую проницаемость мембран митохондрий.

References

1. Orudzheva S.A., Zvyagin A.A. Assessment of functional reserves of cardiovascular system in patients with diabetes. Dangers of anesthesia and anesthetic management capabilities of patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome. *Novosti anesthesiologii and Intensive Care*. 2006; 3:1-19. (in Russian)
2. Velkov V. Free fatty acids — a risk factor for insulin resistance and ischemia: Prospects for risk assessment and diagnosis. *Poliklinika*. 2008; 4: 50-1. (in Russian)
3. Lopaschuk G.D., Ussher J.R., Folmes C.D., Jaswal J.S., Stanley W.C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 2010; 90(1): 207-58.
4. Brindley D.N., Kok B.P.C., Kienesberger P.C., Lehner R., Dyck J.R.B. Shedding light on the enigma of myocardial lipotoxicity: the involvement of known and putative regulators of fatty acid storage and mobilization. *Am J Physiol*. 2010; 298: E897-E908.
5. Chowdhury R., Warnakula S., Kunutsor S., Crowe F., Ward H.A., Johnson L. et al. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2014; 160(6): 398-406.
6. Mozaffarian D., Lemaitre R.H., King I.B., Song X., Huang H., Sacks F.M. et al. Plasma Phospholipid Long-Chain Omega-3 Fatty Acids and Total and Cause-Spe-

cific Mortality in Older Adults: the Cardiovascular Health Study. *Ann Intern Med*. 2013; 158: 515-25.

7. Van Bilsen M., Planavila A. Fatty acids and cardiac disease: fuel carrying a message. *Acta Physiol*. 2014; 211(3): 476-90.

8. Rebrova T.Yu., Kondratieva D.S., Afanasiev S.A., Barzah E.I. Activity of lipid peroxidation and the functional state of the myocardium during cardiac remodeling in rats after experimental myocardial infarction. *Kardiologiya*. 2007; (6): 41-5. (in Russian)

9. Afanasiev S.A., Rebrova T.Yu., Kondratieva D.S. Features phospholipid composition of erythrocyte membranes in a myocardial infarction. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2007; (53): 541-46. (in Russian)

10. Afanasiev S.A., Kondratieva D.S. Popov S.V. Developing a model of comorbidity of heart failure and diabetes mellitus type 1 in the experiment. *Bulleten experimentalnoy Biologii i Meditsyny*. 2012; (153): 523-26. (in Russian)

11. Egorova M.V., Afanasiev S.A., Popov S.V. A simple method for the isolation of cardiomyocytes from adult rat heart. *Bulleten experimentalnoy Biologii i Meditsyny*. 2005; 140: 357-60. (in Russian)

12. Egorova M.V., Afanasiev S.A., Popov S.V. Role of phospholipase A2 in the activation respiration of isolated cardiomyocytes under postinfarction atherosclerosis. *Bulleten experimentalnoy Biologii i Meditsyny*. 2008; 146: 631-33. (in Russian)

13. Egorova M.V., Afanasiev S.A. The regulatory role of free fatty acids in the maintenance of membrane homeostasis heart mitochondria in experimental myocardial ischemia. *Bulleten sibirskoy meditsyne*. 2012; (3): 31-8. (in Russian)

14. Aleksandrov A.A. Diabetic heart: Scramble for mitochondria. *Consilium medicum*. 2003; (5): 509-13. (in Russian)

15. Ashrafian H., Redwood C., Blair E., Watkins H. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet*. 2003; (19): 263-8.

Сведения об авторах:

Афанасьев Сергей Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, e-mail: Tursky@cardio-tomsk.ru;

Егорова Маргарита Владимировна, канд. биол. наук, мл. науч. сотр.;

Куцыкова Татьяна Викторовна, аспирант;

Попов Сергей Валентинович, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, руководитель отд. хирургического лечения сложных нарушений ритма сердца и электрокардиостимуляции.