

УДК 616.43:616-008.9;616 -092.18

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ 17 β -ЭСТРАДИОЛА НА БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА ОВАРИЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС С ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ

Н.И. Горбенко, А.Ю. Борилов, О.В. Иванова, Е.В. Таран, Т.С. Звягина*

“Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского” НАМН Украины,
Украина 61002, г. Харьков, ул. Артема, 10; тел.: +38057-7004536;
факс: +38057-7004538; эл. почта: Gorbenkonat@mail.ru

Исследованы биоэнергетические процессы в митохондриях кардиомиоцитов самок крыс с инсулинорезистентностью, индуцированной хроническим введением фруктозы, в условиях различного обеспечения организма эстрогенами. Оценка интенсивности дыхания изолированных митохондрий сердца полярографическим методом показала, что дефицит эстрогенов приводит к снижению активности комплекса IV, тогда как его сочетание с высокофруктозной диетой вызывает дополнительные нарушения в сопряжении дыхания и окислительного фосфорилирования на уровне комплекса I электронтранспортной цепи. Введение 17 β -эстрадиола тормозит развитие митохондриальной дисфункции в кардиомиоцитах овариэктомированных крыс с инсулинорезистентностью.

Ключевые слова: дефицит эстрогенов, 17 β -эстрадиол, инсулинорезистентность, митохондриальная дисфункция, кардиомиоциты.

ВВЕДЕНИЕ

Изменение гормонального профиля вследствие дефицита эстрогенов у женщин в постменопаузальный период приводит к дисрегуляции обменных процессов и способствует развитию инсулинорезистентности, а также связанного с ней абдоминального ожирения, гипертриглицеридемии, провоспалительного состояния, эндотелиальной дисфункции [1]. При наличии этого комплекса гормонально-метаболических нарушений, получившего название “метаболический синдром”, риск инфаркта миокарда и инсульта увеличивается в три раза, а смертность от сердечно-сосудистых заболеваний возрастает в два раза [2]. Согласно “митохондриальной гипотезе старения”, в основе возрастных и кардиоваскулярных нарушений лежит снижение митохондриями продукции энергии, усиление оксидативного стресса и ускоренный апоптоз клеток [3]. Результаты исследований последнего

десятилетия убедительно свидетельствуют о том, что митохондриальная функция может быть мишенью для регуляторных эффектов эстрогенов в различных типах клеток и тканей. Последнее реализуется за счёт кооперативного действия рецепторов эстрогенов и их ко-регуляторов как в ядерном, так и в митохондриальном геноме [4]. В связи с этим, исследование механизмов действия эстрогенов на митохондриальную функцию кардиомиоцитов является необходимым для расширения представлений о патогенезе и обоснования новых направлений профилактики сердечно-сосудистых заболеваний у женщин в постменопаузальный период.

Целью данной работы было изучение биоэнергетических процессов в митохондриях кардиомиоцитов крыс с метаболическим синдромом, индуцированным хроническим введением фруктозы, в условиях различного обеспечения организма эстрогенами.

* - адресат для переписки

МЕТОДИКА

Эксперимент проведен на 24 трёхмесячных самках крыс линии Вистар, которые были разделены на 4 группы: интактный контроль; овариэктомированные животные; овариэктомированные животные с инсулинорезистентностью, получавшие плацебо; овариэктомированные животные с инсулинорезистентностью, получавшие 17 β -эстрадиол.

Гипоэстрогению воспроизводили путём двусторонней овариэктомии под эфирным наркозом [5]. Через 2 недели после хирургического вмешательства инсулинорезистентность индуцировали введением фруктозы с питьевой водой в концентрации 200 г/л в течение двух месяцев [6].

17 β -эстрадиол вводили внутривенно с помощью зонда в дозе 0,2 мг/кг массы тела в виде водной суспензии, стабилизированной Твином-80, один раз в сутки в течение восьми недель, начиная с первого дня эксперимента [7]. Контрольная группа животных с инсулинорезистентностью получала аналогичный объём растворителя (плацебо). Состояние углеводного обмена характеризовали по уровню базальной гликемии, а также при проведении внутрибрюшинного теста толерантности к углеводам (3 г глюкозы на кг массы тела) и к инсулину (0,5 Ед инсулина на кг массы тела). Уровень глюкозы в крови экспериментальных животных определяли глюкозооксидазным методом с применением анализатора "Эксан-Г" (Литва).

Митохондрии сердца крыс получали методом дифференциального центрифугирования при 7000 g в среде, содержащей 10 мМ трис-НСl буфер pH 7,4, 250 мМ сахарозу, 10 мМ ЭДТА и 0,5% БСА. Дыхание митохондрий регистрировали с помощью закрытого кислородного электрода Кларка в кювете

с постоянной температурой (30°C) в реакционной среде инкубации следующего состава: 150 мМ сахараза, 75 мМ KCl, 10 мМ KН₂PO₄, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-НСl (pH 7,4). ADP добавляли в среду инкубации в конечной концентрации 200 мкМ, субстраты окисления: глутамат+малат – 5 мМ, сукцинат – 8 мМ. По кривым поглощения кислорода рассчитывали скорость дыхания митохондрий в метаболических состояниях 3 (V₃) и 4 (V₄) по Чансу, и дыхательный контроль (V₃/V₄) [8]. Активность цитохром с-оксидазы определяли спектрофотометрическим методом [9].

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики. Определение характера распределения признака в выборке осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для множественных сравнений данных с нормальным распределением проводили параметрический однофакторный дисперсионный анализ ANOVA и применяли метод Стьюдента-Ньюмена-Кейлса [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что высокофруктозная диета может приводить к развитию инсулинорезистентности только у овариэктомированных крыс, поскольку эндогенные эстрогены оказывают протективный эффект в отношении негативного влияния фруктозы на глюкозный гомеостаз [11].

У крыс с гипоэстрогенией под влиянием высоких доз фруктозы развивалась инсулинорезистентность и интолерантность к углеводам, о чём свидетельствовали более высокие показатели площади под гликемическими кривыми при проведении теста толерантности к глюкозе и теста толерантности к инсулину по сравнению с показателями у интактных животных (табл. 1).

Таблица 1. Показатели глюкозного гомеостаза у овариэктомированных крыс с инсулинорезистентностью, индуцированной высокофруктозной диетой, ($\bar{X} \pm Sx$), n=6.

Группа	Площадь под кривой при проведении теста толерантности к глюкозе, ммоль/(л·мин)	Площадь под кривой при проведении теста толерантности к инсулину, ммоль/(л·мин)
Интактный контроль	560,5 \pm 39,2	373,6 \pm 27,8
Овариэктомия	540,2 \pm 31,6	427,8 \pm 28,1
Овариэктомия + фруктоза + плацебо	719,5 \pm 37,2*	536,1 \pm 31,3*
Овариэктомия + фруктоза + 17 β -эстрадиол	484,6 \pm 22,4 [#]	399,47 \pm 15,7 [#]

Примечание: статистически достоверно (p \leq 0,05) по сравнению: * - с интактным контролем; # - с группой "овариэктомия+фруктоза + плацебо".

Следует отметить, что дефицит эстрогенов без сочетания с избытком фруктозы в диете не приводил к развитию инсулинорезистентности и интолерантности к углеводам, что совпадает с результатами наших предыдущих исследований, в которых гипозестрогения сопровождалась снижением чувствительности к инсулину только при её комбинации с высококалорийной нагрузкой [12].

В результате оценки функционального состояния митохондрий кардиомиоцитов овариэктомированных животных было установлено снижение коэффициента дыхательного контроля и увеличение скорости поглощения кислорода в состоянии 4 как в присутствии глутамата и малата, так и сукцината, по сравнению с интактным контролем (табл. 2).

Поскольку в этом метаболическом состоянии энергия трансмембранного потенциала не используется для синтеза АТФ, увеличение скорости потребления кислорода митохондриями экспериментальных животных в состоянии 4 свидетельствует о нарушении механизмов обратной связи и/или разобщении окислительного фосфорилирования.

Снижение дыхательного контроля в условиях гипозестрогении сопровождалось снижением активности цитохром *c*-оксидазы – фермента комплекса IV электронтранспортной цепи по сравнению с группой интактного контроля ($6,85 \pm 0,62$ vs $11,01 \pm 0,56$ мкмоль/мин/мг белка, $p \leq 0,05$).

Содержание овариэктомированных крыс на фруктозной диете приводило к дальнейшему снижению дыхательного контроля и росту потребления кислорода в состоянии 4 при использовании глутамата и малата в качестве субстрата комплекса I (табл. 2).

Обращает на себя внимание тот факт, что диета не изменяла дыхательный контроль в присутствии субстрата комплекса II – сукцината (табл. 2) и активность цитохром *c*-оксидазы ($7,44 \pm 0,64$ vs $6,85 \pm 0,62$ мкмоль/мин/мг белка, $p > 0,05$) в митохондриях овариэктомированных животных. Как известно, сукцинатдегидрогеназа (комплекс II) является FAD-зависимым ферментом, который непосредственно передаёт электроны на убихинон, минуя NAD-зависимый комплекс I.

Таким образом, отсутствие изменений дыхательного контроля в присутствии сукцината (субстрат комплекса II) и его снижение при использовании малата и глутамата (субстраты комплекса I) у овариэктомированных животных может свидетельствовать о том, что высокофруктозная диета вызывает нарушения в сопряжении дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца, главным образом, на уровне комплекса I электронтранспортной цепи. В то же время дефицит эстрогенов, в первую очередь, сопровождается снижением активности комплекса IV электронтранспортной цепи.

Таблица 2. Скорость дыхания изолированных митохондрий сердца овариэктомированных крыс с инсулинорезистентностью, индуцированной высокофруктозной диетой, ($X \pm Sx$), $n=6$.

Группа	V_4 , наторм О/мин/мг белка	V_3 , наторм О/мин/мг белка	Дыхательный контроль
малат и глутамат			
Интактный контроль	$12,21 \pm 0,88$	$108,67 \pm 10,16$	$8,90 \pm 0,59$
Овариэктомия	$17,34 \pm 2,42^*$	$107,33 \pm 8,39$	$6,55 \pm 0,66^*$
Овариэктомия + фруктоза + плацебо	$24,53 \pm 1,43^{*+}$	$122,47 \pm 9,87$	$4,99 \pm 0,24^{*+}$
Овариэктомия + фруктоза + 17 β -эстрадиол	$17,14 \pm 1,80^{*#}$	$123,35 \pm 13,20$	$7,27 \pm 0,51^{*#}$
сукцинат			
Интактный контроль	$63,15 \pm 7,70$	$188,91 \pm 18,37$	$3,08 \pm 0,18$
Овариэктомия	$79,01 \pm 5,11^*$	$184,76 \pm 16,06$	$2,04 \pm 0,20^*$
Овариэктомия + фруктоза + плацебо	$86,95 \pm 7,01^*$	$189,41 \pm 11,71$	$1,96 \pm 0,06^*$
Овариэктомия + фруктоза + 17 β -эстрадиол	$74,84 \pm 4,38^{\#}$	$186,49 \pm 19,20$	$2,47 \pm 0,18^{\#}$

Примечание: статистически достоверно ($p \leq 0,05$) по сравнению: * - с интактным контролем, + - с группой "овариэктомия", # - с группой "овариэктомия + фруктоза + плацебо".

Ранее было показано, что введение 17 β -эстрадиола овариэктомированным животным приводит к повышению экспрессии субъединиц цитохромоксидазы COX I и COX II (митохондриальный геном), COX IV (ядерный геном), которые входят в состав комплекса IV электронтранспортной цепи, а также содержания цитохрома *c* и активности цитохром *c*-оксидазы [13]. Среди возможных механизмов влияния эстрогенов на митохондриальную функцию можно выделить два потенциальных пути. Первый заключается в непосредственном усилении экспрессии митохондриальных белков, которые кодируются как ядерной [14], так и митохондриальной ДНК [15], в результате активации и связывания рецепторов эстрогенов с ERE-последовательностями в промоторах соответствующих генов. Второй механизм связан с активирующим влиянием эстрогенов на экспрессию транскрипционного фактора NRF-1 [16], который является одним из ключевых регуляторов митохондриальной функции и биогенеза [17].

Пероральное введение 17 β -эстрадиола овариэктомированным крысам с инсулинорезистентностью приводило к повышению дыхательного контроля при использовании субстратов обоих комплексов по сравнению с группой плацебо (табл. 1).

Привлекает внимание тот факт, что активность цитохром *c*-оксидазы у животных, получавших 17 β -эстрадиол, не отличалась от показателей группы интактного контроля ($12,66 \pm 0,91$ vs $11,01 \pm 0,56$ мкмоль/мин/мг белка, $p > 0,05$). Следует отметить, что улучшение функционального состояния митохондрий кардиомиоцитов под влиянием экзогенного 17 β -эстрадиола сопровождалось снижением инсулинорезистентности и интолерантности к углеводам у овариэктомированных животных, содержащихся на высокофруктозной диете (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что дефицит эстрогенов и высокоуглеводная диета оказывают различное влияние на функционирование компонентов электронтранспортной цепи митохондрий, а их сочетание аддитивно усиливает митохондриальную дисфункцию.

ВЫВОДЫ

1. Дефицит эстрогенов приводит к дисфункции митохондрий кардиомиоцитов, выражающийся в снижении активности комплекса IV, а его сочетание с высокоуглеводной диетой вызывает дополнительные изменения в сопряжении дыхания и окислительного фосфорилирования на уровне комплекса I электронтранспортной цепи.
2. Введение 17 β -эстрадиола снижает нарушение биоэнергетических процессов в сердечной мышце овариэктомированных крыс с инсулинорезистентностью, что подтверждается повышением дыхательного контроля при использовании NAD- и FAD-зависимых субстратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jackson G. (2008) Menopause Int., **14**, 13–17.
2. Wong N.D. (2007) Am. J. Cardiovasc. Drugs, **7**, 259–272.
3. Duckles S.P., Krause D.N., Stirone C. et al. (2006) Molec. Interventions., **6**, 26–35.
4. Klinge C.M. (2008) J. Cell Biochem., **105**, 1342–1351.
5. Западнюк И.П. (1962) Лабораторные животные, их разведение, содержание и использование в эксперименте, Гос. мед. изд-во УССР, Киев.
6. Levi B., Werman M. (1998) J. Nutrition., **128**, 1442–1449.
7. Mukhina T.V., Lermontova N.N., Van'kin G.I. et al. (2003) Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im., **53**, 208–214.
8. Чанс Б. (1962) Регуляция клеточного обмена (пер. с англ.), М.
9. Straus W. (1956) Biochem. Biophys. Acta., **19**, 58–65.
10. Гланс С. (1998) Медико-биологическая статистика, Практика, М.
11. Galipeau D., Verma S., Mc Neill J. (2002) Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol., **283**, H2478–H2484.
12. Gorbenco N., Taran K., Borikov A. et al. (2009) Diabetologia, **52** (Suppl. 1), S245.
13. Stirone C., Krause N., Procaccio V. et al. (2005) Mol. Pharmacol., **68**, 959–965.
14. O'Lone R., Knorr K., Jaffe I.Z. et al. (2007) Mol. Endocrinol., **21**, 1281–1296.
15. Chen J.Q., Eshete M., Alworth W.L. et al. (2004) J. Cell Biochem., **93**, 358–373.
16. Kelly D.P., Scarpulla R.C. (2004) Genes. Dev., **18**, 357–368.
17. Scarpulla R.C. (2008) Physiol. Rev., **88**, 611–638.

Поступила: 12. 07. 2013.

**EFFECT OF 17 β -ESTRADIOL ON BIOENERGETIC PROCESSES IN THE HEART
MITOCHONDRIA OF OVARECTOMIZED RATS WITH INSULIN RESISTANCE**

N.I. Gorbenko, A.Y. Borikov, O.V. Ivanova, E.V. Taran, T.S. Zvyagina

Institute of Endocrine Pathology Problems, ul. Artyoma, 10, Kharkov, 61002 Ukraine;
tel.: +38057-7004536; fax: +38057-7004538; e-mail: Gorbenkonat@mail.ru

The bioenergetic processes in the heart mitochondria of Wistar rats with fructose-induced insulin resistance was investigated in female animals with different estrogen status. Respiration studies on isolated heart mitochondria by the polarographic method revealed that estrogen deficiency reduced complex IV activity, while its combination with high-fructose diet induced additional disturbances in the coupling of respiration and oxidative phosphorylation at the level of complex I of the electron transport chain. Exogenous 17 β -estradiol inhibited the development of mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes of ovariectomized rats with insulin resistance.

Key words: estrogen deficiency, 17 β -estradiol, insulin resistance, mitochondrial dysfunction, cardiomyocytes.