

О.А.Лоскутов<sup>1</sup>  
О.А.Пивоварова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Киевская городская клиническая больница «Киевский городской центр сердца»

<sup>2</sup> ГУ «Луганский государственный медицинский университет»

**Ключевые слова:** экспериментальный сахарный диабет, митохондрии, preconditionирование.

Надійшла: 12.01.2013

Прийнята: 24.02.2013

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2013.1.54-59>

УДК 616.1-127.-08.35-008.64/092.9

## УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА

*Исследование проведено в рамках научно-исследовательских работ «Вивчення провідних клініко-фізіологічних порушень у хворих, які перебувають у критичних станах, обумовлених травмою, інфекцією та інтоксикацією, з розробкою оптимальних технологій інтенсивної терапії та анестезіологічного забезпечення» (номер государственной регистрации 0108U000170) и «Заболівання органів дихання с поражением желудочно-кишечного тракта. Коморбидная патологія» (номер государственной регистрации 0111U001080).*

**Резюме.** В данной работе на модели изолированного сердца крысы изучены ультраструктурные реорганизации митохондрий, а также установлено preconditionирующее действие севофлурана. Объектом исследования были 47 белых крыс линии Wistar массой 234,00±2,64 г в возрасте 5-6 месяцев. I группа составила 20 особей со стрептозотоциновым диабетом, получавшие глибенкламид. II группа (27 особей) – группа контроля. Ишемия моделировалась после 30-минутной севофлурановой анестезии и составляла в обеих группах 20,4±0,30 минут. В результате исследования было зафиксировано, что процент структурно изменённых митохондрий в субсарколеммарной субпопуляции и в интрамиофибриллярной субпопуляции во II группе был соответственно на 60,6±2,1% и на 67,1±3,4% меньше по отношению к изменениям в I группе. При этом средний диаметр митохондрий у животных II группы был меньше аналогичных значений, наблюдаемых в I группе, как в субсарколеммарной субпопуляции, так и в интрамиофибриллярной субпопуляции соответственно на 21,65±1,3% и 28,57±1,12%. Таким образом, кардиопротекторный эффект севофлурана является мощным механизмом противоишемического действия, точкой приложения которого являются митохондрии как субсарколеммарной, так и интрамиофибриллярной субпопуляции миокарда.

**Морфологія.** – 2013. – Т. VII, № 1. – С. 54-59.

© О.А.Лоскутов, О.А.Пивоварова, 2013

**Loskutov O.A., Pivovarova O.A. Ultrastructural characteristics of the mitochondria in experimental myocardial ischemia.**

**Summary.** In this investigation, on the model of isolated rat heart mitochondria studied ultrastructural reorganization and established preconditioning action of sevoflurane. The study involved 47 white rats of Wistar, with a mass of 234,00±2,64 g, at the age of 5-6 months. Group I consisted of 20 individuals with artificial chemical diabetes treated with glybenclamid. Group II (27 individuals) was a control group. Ischemia was modeled after 30-minutes of sevofluran anesthesia and composed 20,4±0,30 minutes in both groups. As a result of the research it has been noted that the percent of structurally altered mitochondria in subsarcolemmal and intramiofibrillar subpopulations in group II was accordingly on 60,6±2,1% and on 67,1±3,4% less, in relation to the changes in group I. At the same time, the average diameter of the mitochondria in animals of group II was lower than those values observed in the first group, both in subsarcolemmal and in intramiofibrillar subpopulations, accordingly 21,65±1,3% and 28,57±1,12%. Thus, the cardioprotective effect of sevoflurane, is a powerful mechanism of anti-ischemic action, the point of application of which are both of mitochondrial subsarcolemmal subpopulation and intramiofibrillar mitochondrial subpopulation.

**Key words:** experimental diabetes mellitus, mitochondria, preconditioning.

### Введение

Вопросы взаимосвязи структуры и функции митохондрий постоянно находятся в центре внимания широкого круга исследователей (Moens A.L. et al., 2005). Отличительной особенностью ультраструктуры митохондрий является характерная изменчивость их внутренней организации

в ответ на самые различные воздействия физиологического и ингибиторного характера. На основании результатов большого количества детальных исследований проблема взаимосвязи структуры и функции митохондрий при гипоксии в результате ишемического повреждения миокарда привлекала особое внимание исследо-

вателей для поиска способов защиты миокарда от данного патологического воздействия (Todorov B. et al., 2011).

Как указывают в своих работах А.О.Аdesanya и соавторы (2006), в настоящее время известно два наиболее эффективных способа защиты миокарда от гипоксии: ранняя реперфузия и ишемическое preconditionирование (ПреК) миокарда.

Все кардиопротекторные воздействия, направленные на ограничение объёма некроза миокарда, формирующегося в результате ишемического и/или реперфузионного повреждения, разделяются на лечебные (терапевтические) и профилактические (Zaugg M. et al., 2003). В последнее время большое внимание исследователей уделяется изучению кардиопротекторного эффекта ингаляционных анестетиков. Как было показано в работах В.А.Cason и коллег. (1997), ингаляционные анестезирующие средства обладают прямыми кардиопротекторными свойствами, которые нельзя просто объяснить альтерациями коронарного кровотока или миокардиального баланса кислорода. Экспериментальные данные указывают, что ингаляционные анестетики защищают миокард против обратимого и необратимого ишемического повреждения через механизмы, в которых задействованы АТФ-зависимые калиевые каналы подобно наблюдаемому при феномене ишемического ПреК (Tanaka K. et al., 2004). До последнего времени наиболее обоснованной гипотезой механизма ПреК являлась схема сигнальных путей, которая начинается с многочисленных триггеров и сходится к единственному конечному эффектору, в качестве которого рассматривались митохондрии (Лоскутов О. А., и др., 2008; Dow J. et al., 2008).

**Цель** исследования состоит в изучении возможных кардиопротекторных эффектов севофлурана на модели изолированного сердца крысы и выявление конечной точки приложения его preconditionирующего эффекта.

#### **Материалы и методы**

С целью изучения кардиопротективных эффектов preconditionирования нами был проведён эксперимент на 47 белых крысах линии Wistar (исходная масса составляла  $234,00 \pm 2,64$  г возрастом 5-6 месяцев). Работу с животными осуществляли согласно положениям «Общих этических принципов экспериментов на животных», принятых I-м национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и согласно международных требований «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях». Животные были разделены на следующие группы:

I группу составляли 20 лабораторных крыс линии Wistar, с массой тела  $230,70 \pm 3,16$  г в воз-

расте 5-6 месяцев. У подопытных животных данной группы (20 особей) нами был смоделирован стрептозотоциновый сахарный диабет, после чего для коррекции сахара животные получали глибенкламид, который является неселективным блокатором К-АТФ каналов, т. е. обеспечивает блокаду как сарколеммальных, так и гипотетических митохондриальных калиевых каналов. Модель сахарного диабета в этой группе животных воспроизводили однократным внутривенным введением стрептозотоцина – («Sigma», США) в 0,1 М цитратном буфере pH 4,5, в дозе 60 мг/кг. Введение стрептозотоцина осуществляли после предварительной 24-ти часовой депривации пищи при сохраненном доступе к воде. С целью формирования полного и стабильного диабета животных содержали на протяжении 11 суток на стандартной диете.

II группу составили подопытные крысы (27 особей) линии Wistar с массой тела  $228,30 \pm 2,12$  г в возрасте 5-6 месяцев. В экспериментах с целью эвтаназии нами выполнялась цервикальная дислокация, которая позволяла избежать любых потенциальных центрально-протективных эффектов анестетиков.

Выведение животных из эксперимента осуществлялось путем декапитации после предварительной 30-минутной анестезии с помощью ингаляции паров севофлурана.

В обеих группах интервал времени от начала гипоксии до изъятия сердца был фиксированным и составлял в среднем  $20,4 \pm 0,30$  минут. У животных брали кусочки ткани из идентичных участков верхушки сердца. Фиксацию материала производили немедленно, внося образцы ткани в забуференный 2,5% раствор глутарового альдегида. Префиксация материала осуществлялась с помощью реактива Колфилда (на основе 2% раствора четырехоксида осмия, pH 7,3; реактивы фирмы «Sigma», США). Обезвоживание материала производили в спиртах возрастающей концентрации, абсолютном спирте и ацетоне. Последующая заливка в эпон-аралдит (фирмы «Fluka», Швейцария) проводилась по общепринятой методике (Карупу В. Я., 1984).

Ультратонкие срезы толщиной 40-60 нм контрастировали 1% раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца (реактивы фирмы «Sigma», США) по методике Рейнольдса. Просмотр препаратов осуществляли с помощью электронного микроскопа ПЕМ-125К (Украина).

#### **Результаты и их обсуждение**

У лабораторных животных I группы был определен мембранолиз сарколеммы кардиомиоцитов и повреждения их органелл в результате ишемии. Ультраструктурная реорганизация митохондрий характеризовалась потерей фрагментов мембран, разрушением крист и вакуолизацией, что сочеталось с возрастанием величины их среднего диаметра и набуханием (рис. 1).

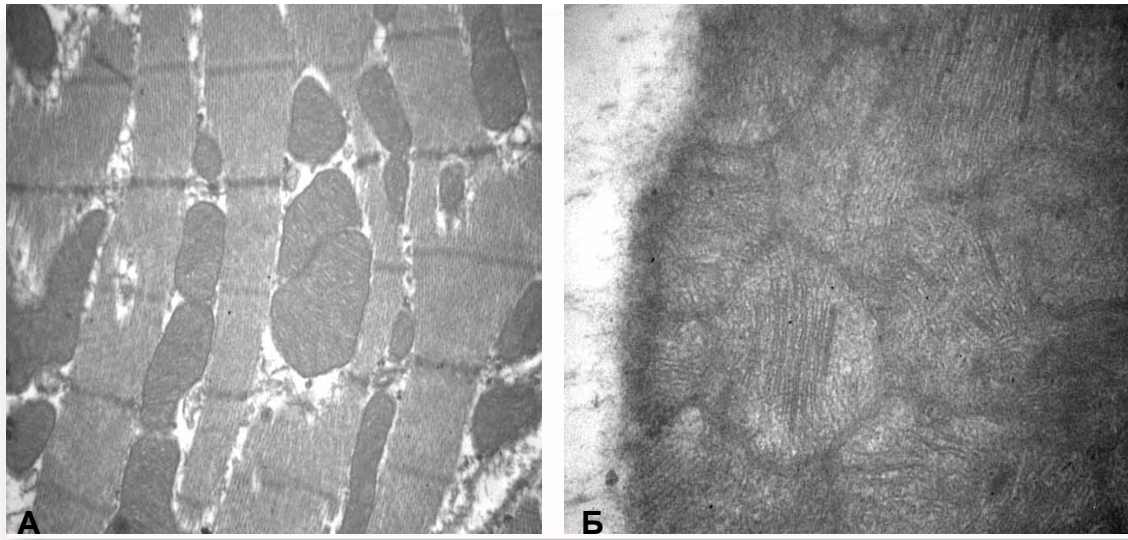


Рис. 1. Кардиомиоцит с признаками повреждения. Уплотнение митохондриальных мембран. Электроннограмма. А -  $\times 12000$ , Б -  $\times 25500$ .

Гипоксически-ишемические нарушения носили выраженный мозаичный характер – участки полной сохранности ткани сочетались с участками анизотропии дисков, глыбчатым распадом миофибрилл или их деструкцией, а также повреждениями Z-полос саркомера. В Т-системе наблюдалось увеличение общего количества канальцев и цистерн.

Согласно полученному материалу можно

было говорить о маргинации хроматина и о просветлении нуклеоплазмы. При этом максимальный диаметр цистерн эндоплазматического ретикулума был увеличен на  $52,0 \pm 4,6\%$ , а их площадь – с  $431,0 \pm 29,6$  у.е. до  $732,7 \pm 46,1$  у.е., что говорило об их значительном расширении и принято рассматривать как напряжение кальциевого обмена (рис. 2).

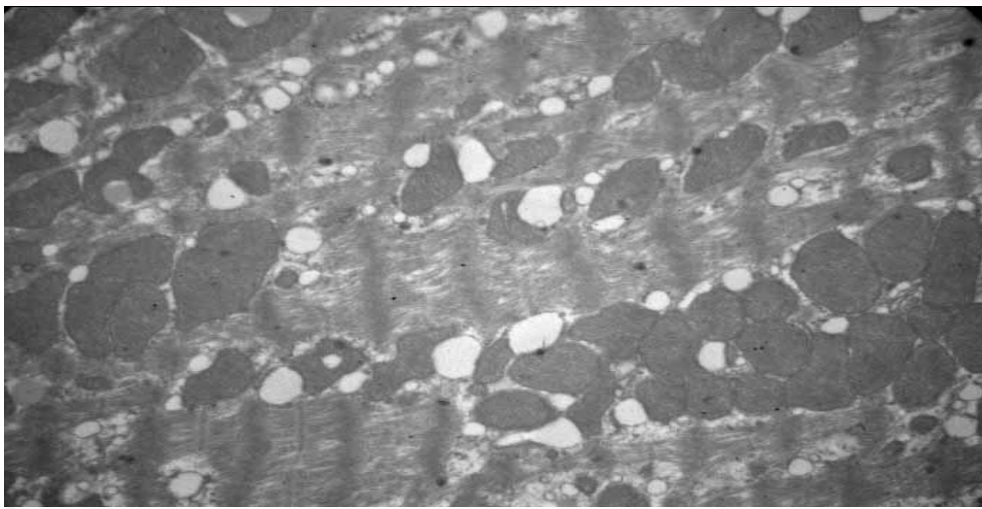


Рис. 2. Расширение цистерн эндоплазматического ретикулума. Электроннограмма.  $\times 12000$ .

О напряжении обменных процессов говорили и наблюдаемое усиление пиноцитоза в эндотелии капилляров (рис. 3).

При исследовании электронограмм после глобальной миокардиальной ишемии наблюдались участки деструкции эндотелиального слоя с резким увеличением перикапиллярных пространств и выраженным краевым отёком кардиомиоцитов.

Полученные данные во II группе свидетель-

ствовали о менее выраженных гипоксических изменениях:

- при исследовании кардиомиоцитов отмечено незначительное сокращение ( $1,54$  мкм), отсутствие в большинстве участков лизиса миофибрилл;

- ядра кардиомиоцитов содержали эухроматин и имели небольшие инвагинации кариолеммы вследствие сокращения кардиомиоцита;



Рис. 3. Усиление пиноцитоза в эндотелии капилляров. Электроннограмма.  $\times 12000$ .

– митохондрии кардиомиоцитов многочисленные, гетерогенные, с плотным матриксом;  
 – для саркоплазмы большинства исследуемых препаратов было характерно отсутствие выраженных ультраструктурных изменений, наличие множества секреторных гранул, гранул липофусцина, умеренного количества гранул гликогена. Сарколемма на большом протяжении

была сохранена.

Процент структурно изменённых митохондрий в субсарколеммарной и интрамиофибриллярной субпопуляциях у лабораторных крыс II группы был соответственно в среднем на  $60,6 \pm 2,1\%$  и на  $67,1 \pm 3,4\%$  меньше, по отношению к подобным изменениям, зафиксированным в I группе (рис. 4).

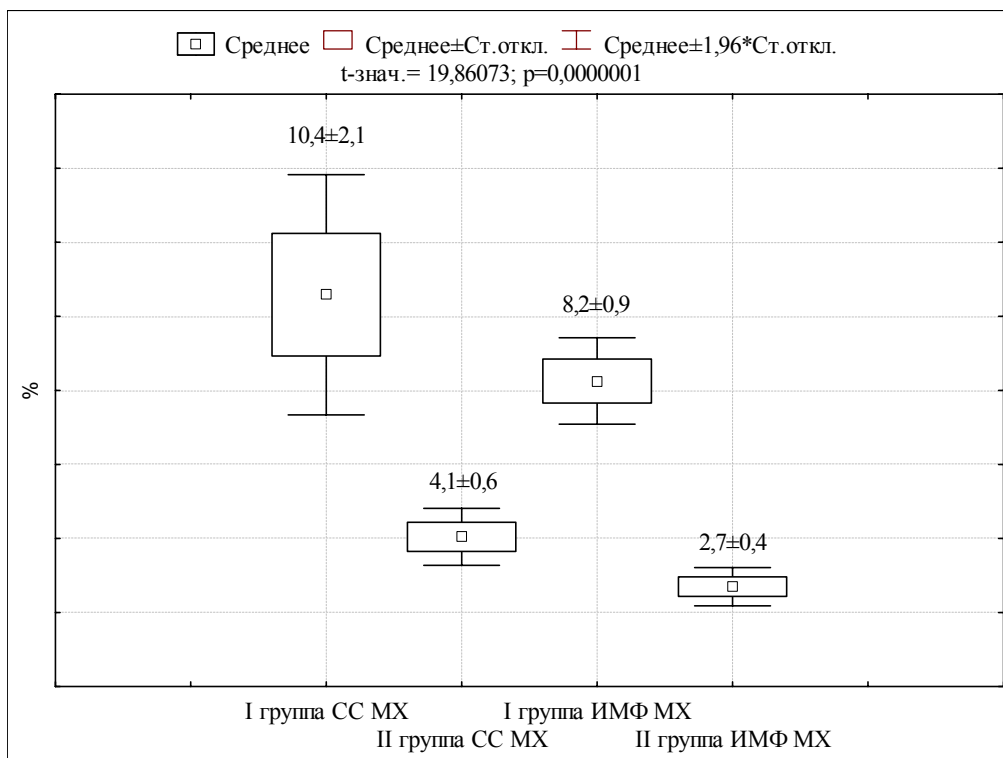


Рис. 4. Диаграмма размаха для количества структурно изменённых митохондрий в субсарколеммарной и в интрамиофибриллярной субпопуляциях в группах исследования (N=47).



При этом средний диаметр митохондрий у подопытных животных II группы был меньше значений, наблюдаемых в I группе в субсарколе-

марной и интрамиофибриллярной субпопуляциях соответственно на  $21,65 \pm 1,3\%$  и  $28,57 \pm 1,12\%$  (рис. 5).

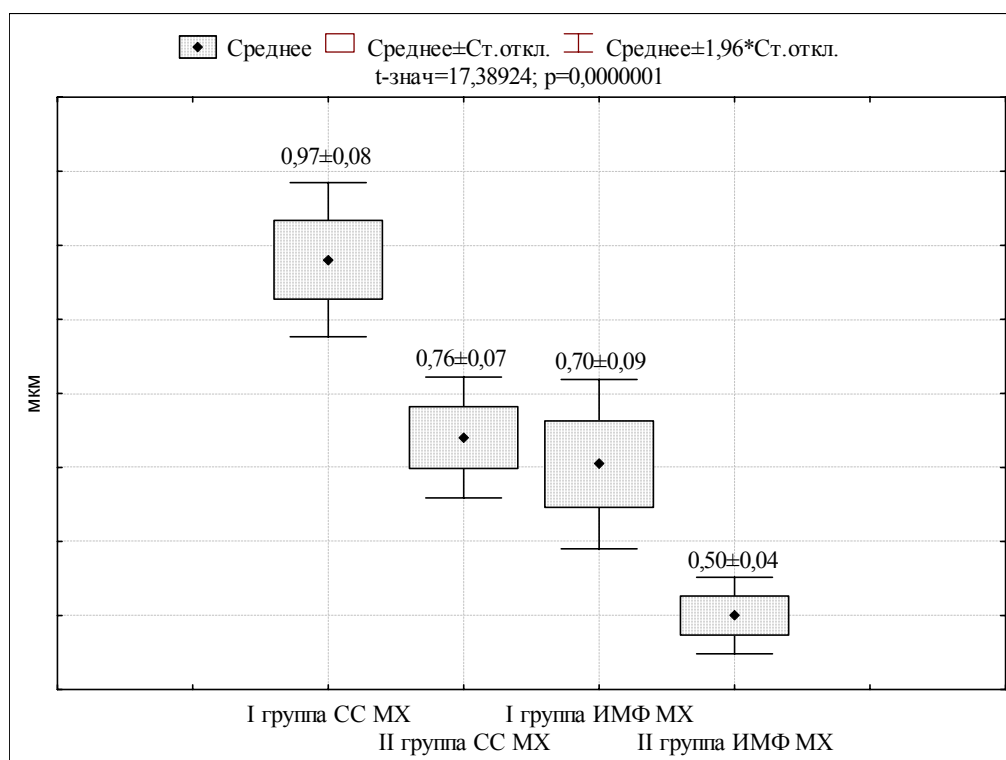


Рис. 5. Диаграмма размаха для среднего диаметра митохондрий в субсарколеммарной и интрамиофибриллярной субпопуляциях в группах исследования (N=47).

В межгрупповых показателях, характеризующих количество активных капилляров на единице площади, достоверных изменений не наблюдалось.

Таким образом, проведённый электронномикроскопический анализ миокарда выявил нарушение субклеточной структуры кардиомиоцитов в периоде глобальной ишемии в обеих исследуемых группах. Однако, в группе лабораторных животных, у которых не проводилось ингибирование К-АТФ чувствительных каналов и для анестезии использовался севофлуран, наблюдалось меньшее ультраструктурное повреждение митохондрий. При этом лучшая переживаемость ишемии наблюдалась как в субсарколеммарной, так и в интрамиофибриллярной субпопуляциях митохондрий.

### Выводы

Активизация К-АТФ чувствительных каналов, вызываемая севофлураном, является мощным механизмом противоишемического действия, точкой приложения которого являются митохондрии как субсарколеммарной, так и интрамиофибриллярной субпопуляций. Данный феномен эффективно защищает миокард от ишемического повреждения и поэтому требует дальнейшего изучения и широкого внедрения в клиническую практику.

**Перспективы дальнейших разработок** заключаются в изучении вопросов о внутрисклеточных изменениях клетки при гипоксии/ишемии с определением уровня АТФ при различном временном интервале ишемического воздействия.

### Литературные источники

Влияние Севофлюрана (севорана) на preconditionирование миокарда / О. А. Лоскутов, В. В. Суслов, Н. В. Гончаренко [и др.] // Біль, знеболювання та інтенсивна терапія. – 2008. – № 2. – С. 179-182.

Карупу В. Я. Электронная микроскопия / В. Я. Карупу – К.: Вища школа, 1984. – 208 с.

Anaesthetics and cardiac preconditioning / M. Zaugg, E. Lucchinetti, M. Uecker [et al.] // Brit. J. Anaesth. – 2003. – Vol. 91. – № 4. – P. 551-565.

Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits / B. A. Cason, A. K. Gamperl, R. E. Slocum [et al.] // *Anesthesiology*. – 1997. – Vol. 87. – P. 1182-1190.

Dow J. Ischemic postconditioning's benefit on reperfusion ventricular arrhythmias is maintained in the senescent heart / J. Dow, A. Bhandari, R. A. Kloner // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2008. – Vol. 13, № 2. – P. 141-148.

Management of perioperative myocardial infarction in noncardiac surgical patients / A. O. Adesanya, J. A. de Lemos, N. B. Greilich [et al.] // *Chest*. – 2006. – Vol. 130. – P. 584-596.

Mechanisms of cardioprotection by volatile anesthetics / K. Tanaka, L. M. Ludwig, J. R. Kersten [et al.] // *Anesthesiology*. – 2004. – Vol. 100, № 3. – P. 707-721.

Myocardial ischemia/reperfusion injury, a clinical view on a complex pathophysiological process / A. L. Moens, M. J. Claeys, J. P. Timmermans [et al.] // *Int. J. Cardiol.* – 2005. – Vol. 100, № 2. – P. 179-190.

The immediate results of coronary artery bypass grafting in patients with low ejection fraction of left ventricle / B. Todurov, V. Shevchenko, O. Loskutov [et al.] // *Kardiochirurgia I Torakochirurgia Polska*. – 2011. – T. 8, № 2. – P. 24-25.

**Лоскутов О.А., Півоварова О.А. Ультроструктурна характеристика мітохондрій в умовах експериментальної ішемії міокарда.**

**Резюме.** У даній роботі на моделі ізольованого серця щура вивчені ультроструктурні реорганізації мітохондрій, а також встановлено прекондеціонуюча дія севофлурана. Об'єктом дослідження були 47 білих щурів лінії Wistar масою  $234,00 \pm 2,64$  г віком 5-6 місяців. I групу склали 20 тварин зі стрептозотциновим діабетом, що одержували глібенкламід. II група (27 тварин) – група контролю. Ішемія моделювалася після 30-хвилинної севофлуранової анестезії і становила в обох групах  $20,4 \pm 0,30$  хвилин. У результаті дослідження було зафіксовано, що відсоток структурно змінених мітохондрій у субсарколемальній субпопуляції й в інтраміофібрилярній субпопуляції в II групі був менший на  $60,6 \pm 2,1\%$  і на  $67,1 \pm 3,4\%$  відповідно відносно змін в I групі. При цьому середній діаметр мітохондрій у тварин II групи був менше аналогічних значень, які спостерігались у I групі, як у субсарколемарній субпопуляції, так і в інтраміофібрилярній субпопуляції, відповідно на  $21,65 \pm 1,3\%$  і  $28,57 \pm 1,12\%$ . Таким чином, кардіопротекторний ефект севофлурана є потужним механізмом проти ішемічної дії, кінцевою ланкою якого є мітохондрії як субсарколемарної, так і інтраміофібрилярної субпопуляції міокарда.

**Ключові слова:** експериментальний цукровий діабет, мітохондрії, прекондиціонування.