

## **ВЛИЯНИЕ ИШЕМИЧЕСКОЙ ГИПОПЕРФУЗИИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА ПУСТЫМИ ЛИПОСОМАМИ И ЛИПОСОМИ С АНТИОКСИДАНТАМИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ МИОКАРДА**

**Мухамадияров Р.А.<sup>1</sup>, Сергеева Е.А.<sup>1</sup>, Зинчук В.Г.<sup>2</sup>, Зинчук С.Ф.<sup>2</sup>, Плотников М.Б.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, e-mail: rem57@rambler.ru;

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Кемерово;

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», Томск

---

В экспериментах на изолированных сердцах крыс, перфузируемых по методу Лангендорфа выполнено сравнительное исследование влияния 30-минутной ишемической гипоперфузии пустыми липосомами и липосомами с антиоксидантами (эмоксипин и дигидрокверцетин) на ультраструктурную сохранность миокарда после 15 минутной реперфузии. После реперфузии сердца подвергали стандартной пробоподготовке для электронно-микроскопических исследований. Результаты исследования показали, что все использовавшееся липосомальные композиции снижали ультраструктурные повреждения тканей после цикла ишемия-реперфузия, но демонстрировали различную активность. Наилучшую сохранность ультраструктуры миокарда наблюдали в группе с гипоперфузией пустыми липосомами. Худшая сохранность сердец в группах с гипоперфузией антиоксидантами может быть обусловлена большей функциональной нагрузкой этих сердец во время реперфузии. Таким образом, полученные результаты показали, что ультраструктурные перестройки клеток миокарда при ишемической гипоперфузии сердца с последующей реперфузией зависят от состава липосомальной композиции.

Ключевые слова: миокард, ультраструктура, липосомы, антиоксиданты.

## **HYPOPERFUSION OF ISOLATED HEART BY EMPTY LIPOSOMES AND LIPOSOMES WITH ANTIOXIDANTS AFFECTS ULTRASTRUCTURE OF MYOCARDIUM**

**Mukhamadiyarov R.A.<sup>1</sup>, Sergeeva E.A.<sup>1</sup>, Zinchuk V. G.<sup>2</sup>, Zinchuk S.F.<sup>2</sup>, Plotnikov M. B.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, e-mail: rem57@rambler.ru;

<sup>2</sup>Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo;

<sup>3</sup>Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E. D. Goldberg, Tomsk

---

Isolated rat hearts were perfused by Langendorff method and underwent 30 min ischemic hypoperfusion by empty liposomes and liposomes with antioxidants (epoxipine and dihydroquercetin) following 15 min reperfusion. Hearts were exposed standard probe preparing for electro-microscoping research after the reperfusion. Results of research showed that all used composition of liposomes had reduced ultrastructural damages of tissues after circle of ischemia-reperfusia, but had demonstrated different activity. The extent of damaged myocardium was lower after exposition to empty liposomes compared to liposomes with antioxidants. This can be explained by higher functional stress during the reperfusion after exposition to liposomes with antioxidants. The results showed that ultrastructural rebuildings of miocardian cells during the ischemic hypoperfusion with followed reperfusion had depended on exposition of liposomes.

Keywords: myocardial ultrastructure, liposomes, antioxidants.

Для эффективной коррекции ишемических и реперфузионных повреждений сердца необходимо создание транспортных систем для адресной доставки фармакологических препаратов в зоны повреждения.

Одним из направлений в этом аспекте является разработка транспортных контейнеров для фармацевтических препаратов на основе использования липосом. Одной из важнейших особенностей липосом является их способность накапливаться и оставаться в зонах инфаркта в результате проявления эффекта «пассивного нацеливания» [5].

Ранее нами было показано, что при гипоперфузии изолированного сердца во время тотальной нормотермической ишемии происходит накопление липосом в клетках миокарда, которые распределяются во внутриклеточных органеллах. Поглощение и внутриклеточное распределение липосом зависит от состава липидного состава наночастиц [2]. При изучении физиологических параметров миокарда показано, что эффект гипоперфузии изолированного миокарда липосомальными препаратами проявлялся в восстановлении сократительной и насосной функций сердца и восстановлении коронарного протока [3, 6]. Протективный эффект наблюдался не только при использовании липосом, нагруженных антиоксидантами, но и пустых липосом.

Так как липосомальные формы антиоксидантов на функциональном уровне проявляют выраженное протективное действие при реперфузионных повреждениях сердца, представляет интерес изучение этого эффекта на ультраструктурном уровне.

**Цель работы:** выявить характер ультраструктурных изменений в миокарде изолированного сердца крыс после ишемической гипоперфузии пустыми липосомами и липосомами нагруженными эмоксипином и дигидрокверцетином.

### **Материалы и методы**

#### **Приготовление липосом**

Липидную часть липосом формировали из смеси яичного лецитина и холестерина в молярном отношении 7:5. Эмоксипин в виде водного раствора добавляли на этапе гидратации липидной пленки при получении мультиламелярных везикул. Липосомы готовили методом экструзии (экструдер Lipex Biomembranes Inc., Канада) с использованием поликарбонатных фильтров (Costar, США) с диаметром пор 30 нм. Перед использованием липосомы разбавляли физиологическим раствором до концентрации 10 мг/мл. Дигидрокверцетин добавляли в липидную смесь в концентрации 25 мг/мг липида.

Размер и заряд полученных частиц измеряли при помощи прибора Zetasizer Nano ZS90 (UK).

#### **Перфузия изолированного сердца**

Исследование проводили на изолированных сердцах крыс Wistar с массой тела  $350 \pm 20$  г. Для исключения влияния сезонных колебаний на устойчивость сердца к повреждающему действию ишемии-реперфузии, все эксперименты проводились в осенне-зимний период. Сердца извлекали у животных под этаминаловым наркозом (45 мг/кг) и помещали в «ледяной» (2-4°C) раствор Кребса-Хензеляйта до полной остановки спонтанных сокращений. Далее производили ретроградную перфузию сердца методом Langendorff в течение 10 мин перфузионным раствором, насыщенным карбогеном (95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>) при 37°C. На 10 минуте перфузии регистрировали коронарный проток. Через 10 минут сердца подвергали 30-

минутной нормотермической тотальной ишемии, во время которой осуществляли гипоперфузию изучаемыми препаратами со скоростью 0,1 мл/мин. После ишемии возобновляли перфузию по Langendorff. На 5 минуте реперфузии регистрировали объем коронарного протока. Затем сердца снимали с системы перфузии и использовали для ультраструктурных исследований. В качестве группы сравнения (ФР) использовали сердца с ишемической гипоперфузией физиологическим раствором. Сердца опытных групп гипоперфузировали «пустыми» липосомами (группа ПЛ), липосомами, содержащими эмоксипин (группа ЭМЛ), и липосомами с дигидрохверцетином (группа ДГЛ). Для группы контроля использовали сердца после 40 минутной непрерывной перфузии по Лангендорфу. Конечная концентрация липосом в среде для гипоперфузии составила 10 мг/л в пересчете на липиды. Концентрация эмоксипина и дигидрохверцетина в составе липосомальной композиции составляла 0,25 мг/мл.

В каждой группе использовали по 6 сердец.

#### **Ультраструктурные исследования**

По окончании ишемической экспозиции, выполняли 10 минутную реперфузию миокарда оксигенированным раствором Кребса-Хензеляйта. Затем сердце вновь помещали в «ледяной» раствор Кребса-Хензеляйта и после полной остановки сокращений отрезали верхушку миокарда. Выделенный фрагмент разрезали на кусочки объемом 1 мм<sup>3</sup> и фиксировали в 3% растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере в течение 1,5 ч при температуре 4°С с постфиксацией в 1% растворе OsO<sub>4</sub> на том же буфере в течение 1 ч 10 мин при 25° С. Обезвоживание проводили при комнатной температуре в восходящих концентрациях этанола. Затем пробы переносили в 100 % ацетон. Для заливки использовали эпоксидную смесь Аралдит (Fluka). Вначале образцы помещали в смесь Аралдит/ацетон (1:1) на 2 часа, а затем пропитывали смолой в течение 12 часов. После пропитки и переноса в свежую порцию смолы проводили полимеризацию при 60° С в течение 24 ч. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-Nova (Швеция), далее их контрастировали раствором уранила ацетата и цитратом свинца (по Рейнольдсу). Просмотр осуществляли в электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss) при ускоряющем напряжении 80 Кв в Центре коллективного пользования приборами и оборудованием "Высокие технологии и аналитика наносистем» НГУ.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0. Рассчитывали средние значения и ошибку среднего. При статистической обработке использовали t-критерий Стьюдента; различия между величинами показателей считали достоверными при  $p < 0,05$ .

#### **Результаты и обсуждение**

## Размер и заряд липосом

Полученные липосом имели средний диаметр частиц 67 нм и zeta-потенциал поверхности – 2,62 мВ.

## Коронарный проток

Таблица 1

Объем коронарного протока сердца ( $M \pm m$ ): исходные значения (Исх) и на 5 минуте реперфузии (РП)

	Группы			
	ФР	ПЛ	ЭМЛ	ДГЛ
Исх.	11,0±0,6	11,4±0,5	11,6±0,7	11,0±0,5
РП	4,5±0,3* <sup>+</sup>	14,0±0,4* <sup>+</sup>	16,1±0,7* <sup>+</sup>	15,4±0,5* <sup>+</sup>

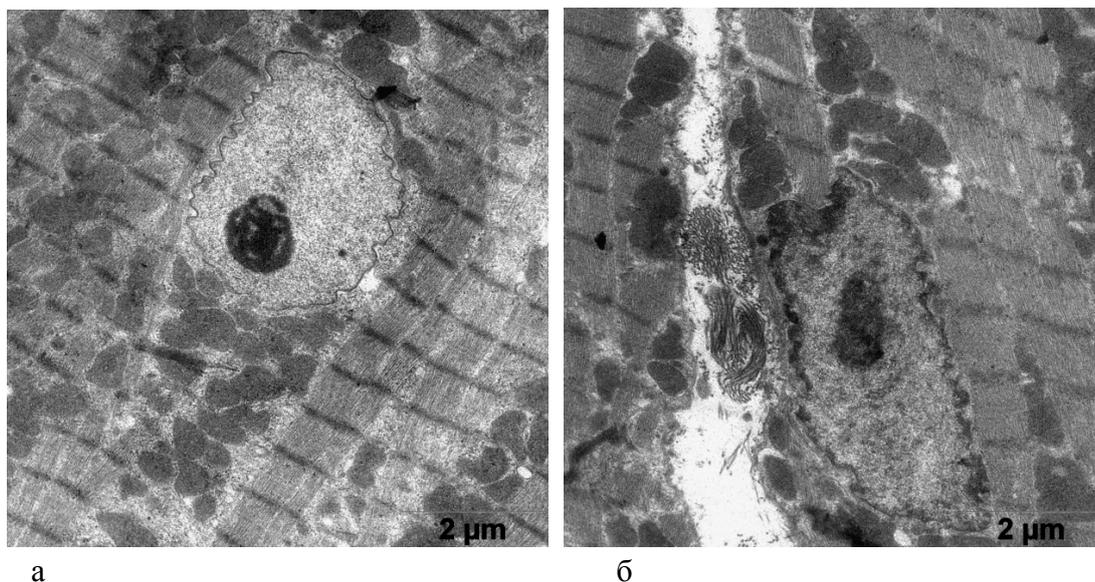
\*-  $p < 0,05$  по сравнению с ФР, <sup>+</sup> -  $p < 0,05$  по сравнению с исходными значениями.

Через 30 минут ишемической реперфузии физиологическим раствором на 5 мин реперфузии наблюдали снижение объема коронарного протока приблизительно на 41% относительно исходных значений (табл. 1). В случае гипоперфузии липосомальными препаратами наблюдали противоположный эффект – достоверное увеличение коронарного протока.

## Мофологические изменения после ишемической гипоперфузии и реперфузии

### Группа контроль

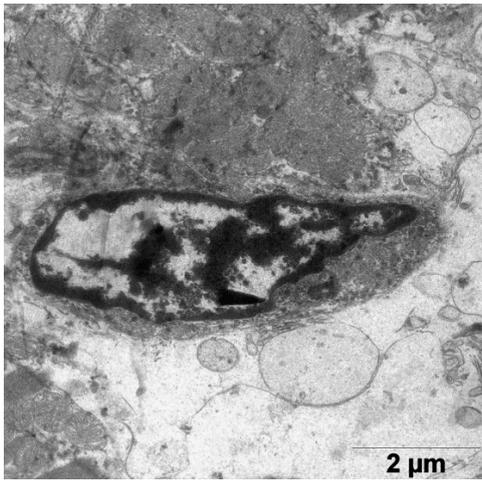
Электронномикроскопическое исследование кардиомиоцитов крыс в группе показало: в кардиомиоцитах фибрилы упорядочены относительно продольной оси клеток, между которыми располагаются плотно упакованные конгломераты митохондрий, в основном округлой и овальной формы (рис. 1). В саркоплазме, между митохондриями и миофибриллами, а также между филаментами видны везикулы незернистой саркоплазматической сети. Трубочки Т-системы на продольных срезах располагаются на уровне Z-полос, к ним с двух сторон примыкают цистерны саркоплазматической сети (рис. 1а, б). В околоядерной зоне находится большое количество митохондрий с поперечными кристами и везикулы саркоплазматической сети. Ядра кардиомиоцитов, большей частью, овальной формы с небольшими инвагинациями ядерной мембраны. Гетерохроматин расположен тонким слоем вдоль нуклеолеммы, а также равномерно распределяется в виде глыбок по всей нуклеоплазме. У полюсов ядер располагается комплекс Гольджи, представленный вытянутыми цистернами, мелкими пузырьками и вакуолями. В большей части в области комплекса Гольджи, реже в саркоплазме встречаются единичные секреторные гранулы на разных стадиях созревания (рис.1б).



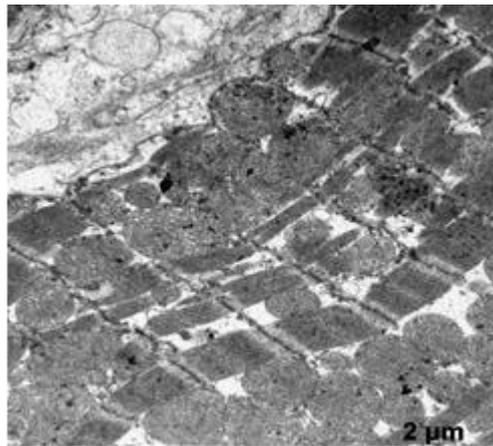
*Рис.1. Ультраструктура миокарда в группе контроль*

### **Группа ФР**

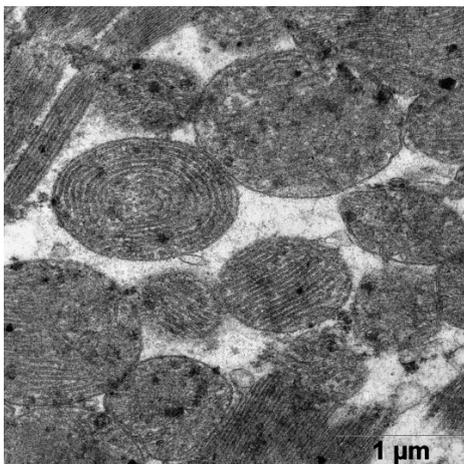
Ультраструктурные изменения клеток после ишемической гипоперфузии физиологическим раствором носили мозаичный характер: на одном и том же образце наблюдали участки с хорошей сохранностью ткани и участки с высокой степенью тканевой деструкции. В этих участках наблюдали значительное расширение цистерн эндоплазматического ретикулума с их частичной деструкцией, глыбчатый распад миофибрилл, анизотропия дисков, повреждение Z-полос саркомерв. В Т-системе наблюдалось увеличение общего количества канальцев и цистерн. Ядра клеток приобретали полигональную форму, хроматиновые глыбки были крупнее по сравнению с контрольной группой и располагались в виде ободка вблизи кариолеммы (рис. 2а). Появляются просветлённые участки цитоплазмы между миофибриллами (рис. 2б). Миофибриллы расположены более рыхло. Наблюдаются группы гранул, различной плотности (рис. 2а, б). Митохондрии приобретали округлую форму и содержали электронно-плотные включения. У единичных митохондрий наблюдали появление спирально расположенных крист (рис. 2в). В цитоплазме клеток присутствовали многочисленные лизосомы различной плотности, что свидетельствует о напряжении обменных процессов.



а



б



в

*Рис. 2. Ультраструктура миокарда после ишемической гипоперфузии пустыми липосомами*

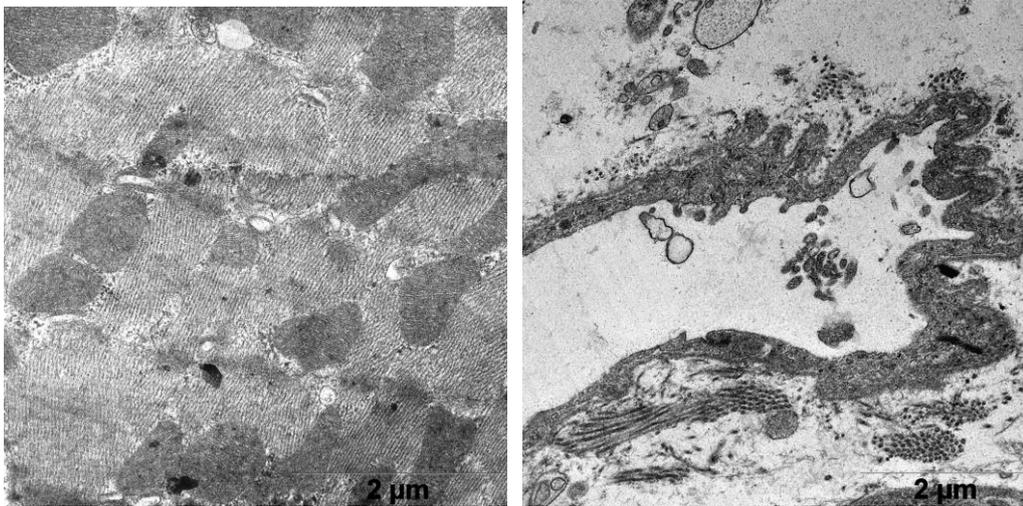
### **Группа ПЛ.**

Ультраструктурные изменения клеток в этой группе были менее выражены относительно группы ФР. Отмечена высокая сохранность митохондрий - их формы и расположения крист, наличие плотного матрикса (рис.3а). В некоторых клетках наблюдали отдельные митохондрии с признаками набухания.

Отмечали незначительное расширение энтоплазматического ретикулума вблизи Т-системы, без его деструкция.

После ишемической гипоперфузии пустыми липосомами, по сравнению с контрольной группой, наблюдали расширение перикапиллярного пространства (рис. 3 б).

В цитоплазме клеток эндотелия наблюдали большое количество вакуолей и микропиноцитозных пузырьков с различной электроннои плотности, что является свидетельством интенсификации процессов выведения (рис. 3 б).



а

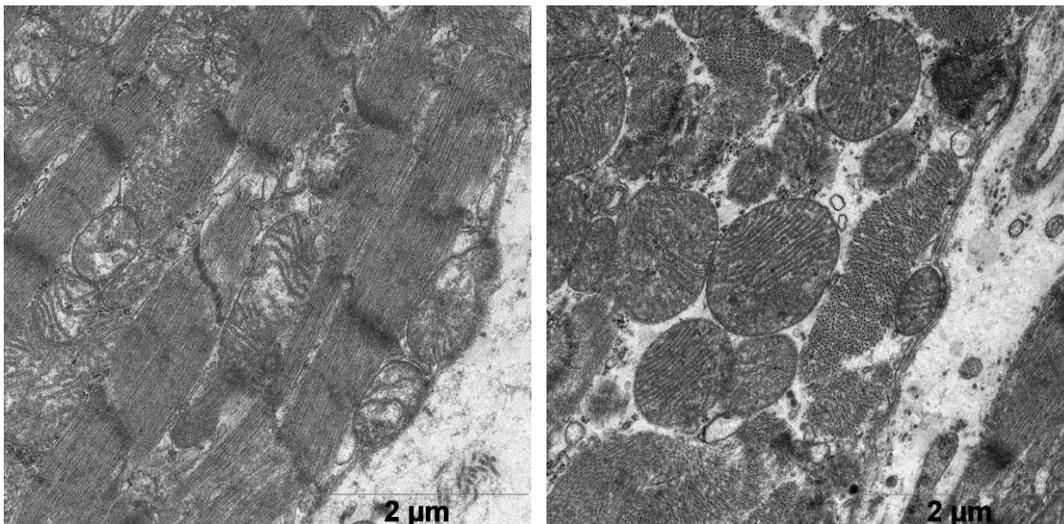
б

*Рис. 3. Ультраструктура миокарда после ишемической гипоперфузии пустыми липосомами*

### **Группа ДГЛ**

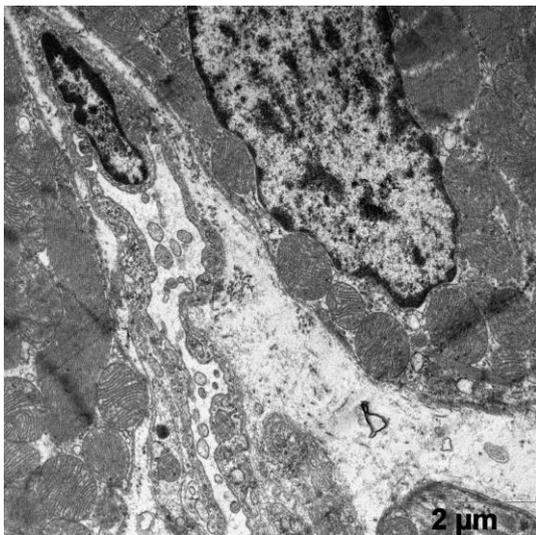
В этой группе отмечена меньшая ультраструктурная сохранность клеток миокарда, по сравнению с группой ПЛ. Наблюдали участки разрушения крист в митохондриях (рис. 4а, б). Ядра кардиомиоцитов приобретали неправильную полигональную форму с увеличенным количеством хроматина, который располагался по периметру кариолеммы (рис. 4в). Кроме того, отмечено появление глыбок хроматина внутри ядра. В клетках хорошо развит зернистый эндоплазматический ретикулум, что свидетельствует о синтетической их активности.

Наблюдаемое усиление пиноцитоза в эндотелии капилляров (рис. 4б, в), указывает на напряжение обменных процессов.



а

б

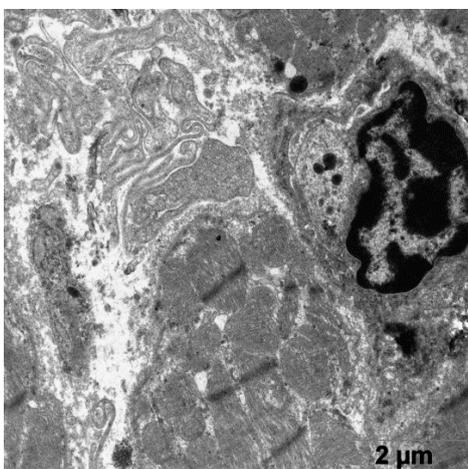


В

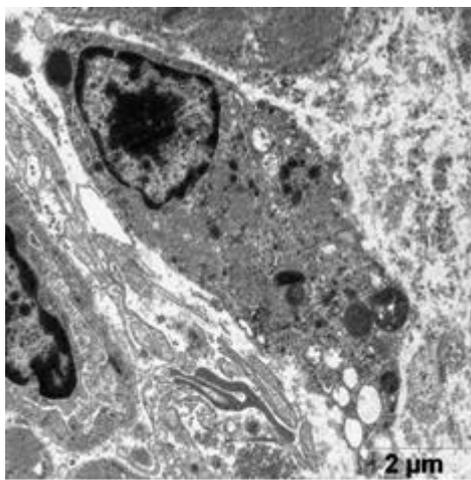
*Рис. 4. Ультраструктура миокарда после ишемической гипоперфузии липосомами с дегидроэпандростероном*

### **Группа ЭМЛ**

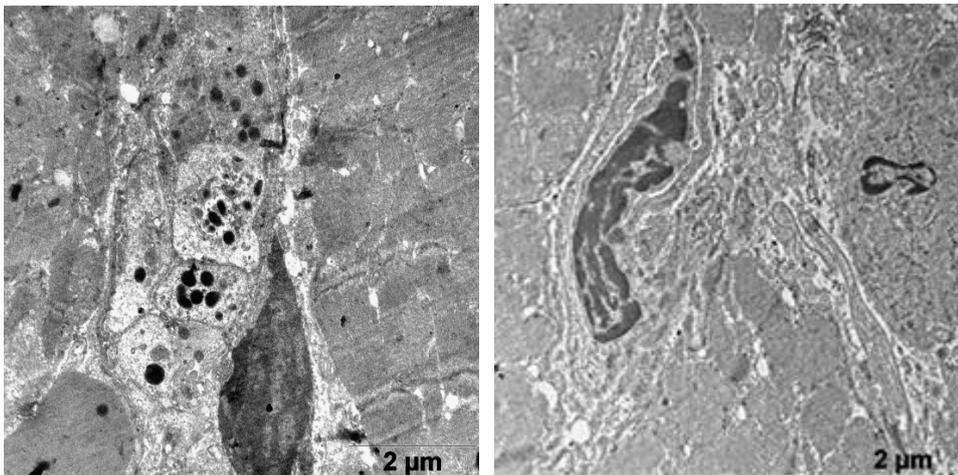
В этой группе наблюдали появление ядер округлой полигональной формы с множеством ламел, с большими активными ядрышками, большим количеством хроматина расположенного широкой полосой под кариолеммой, внутривенная часть ядра также содержала плотный хроматин (рис. 5а, б). Отмечены многочисленные рибосомы в виде отдельных конгломератов и в составе развитого зернистого ЭПР (рис 5а). Часто встречались лизосомы разной плотности, много митохондрий с разрушенными кристами (рис 5а). Отмечаются скопления секреторных гранул натрийуретического пептида на сосудистых полюсах, что свидетельствует об активации секреторной активности данных клеток (рис. 5в). Наблюдали очаги набухания в цитоплазме с элементами дефрагментации (рис. 5г). Филаменты более рыхлые и менее электронно-плотные. В цитоплазме эндотелиальных клеток наблюдали появление пиноцитозных пузырьков.



а



б



В

Г

*Рис. 5. Ультраструктура кардиомиоцитов после ишемической гипоперфузии липосомами с эмоксипином*

Представленные результаты указывают на отсутствие прямой зависимости между уровнем ультраструктурной сохранности миокарда и функциональной активностью сердца при реперфузии. Так, ранее было показано, что, в отношении сократительной активности, липосомальные композиции с антиоксидантами обладают более выраженным защитным эффектом по сравнению с пустыми липосомами [3]. Однако на ультраструктурном уровне в группе ПЛ наблюдали наилучшую сохранность субклеточных структур по сравнению с группами ЭМЛ и ДГЛ.

Известно, что ультраструктурные изменения кардиомиоцитов коррелируют с биохимическими и физиологическими показателями работы сердца как органа [1, 4, 7]. Однако характер корреляции может иметь как прямую зависимость, так и обратную. Такая реакция может быть обусловлена сложностью протекающих процессов имеющих различные временные характеристики. Биохимические и физиологические реакции клеток протекают одновременно с морфологическими перестройками и тесно взаимосвязаны между собой, но их скорость значительно выше, чем изменения ультраструктуры. В нашем случае худшая структурная сохранность клеток в группах ДГЛ и ЭМЛ, относительно ПЛ, может рассматриваться как морфологическое отражение более интенсивной работы миокарда и большей функциональной нагрузкой на клетки в период реперфузии.

Таким образом, полученные результаты показали, что ультраструктурные перестройки клеток миокарда при ишемической гипоперфузии сердца с последующей реперфузией зависят от состава липосомальной композиции.

### **Список литературы**

1. Лоскутов О.А., Пивоварова О.А. Ультраструктурная характеристика митохондрий в

условиях экспериментальной ишемии миокарда. Морфология. 2013. Том VII. № 1. С. 54-59

2. Мухамадияров Р.А., Веремеев А.В., Журавлева И.Ю. Интракоронарное введение липосомальных препаратов в условиях гипотермической ишемии как способ интраоперационной защиты миокарда. Фундаментальные исследования. – 2012. – № 10–2. – С. 266-270.

3. Торопова Я.Г., Мухамадияров Р.А., Головкин А.С. Влияние различных концентраций липосомальной формы эноксипина на коронарный поток, сократительную и насосную функции изолированного сердца крысы в условиях тотальной нормотермической ишемии и реперфузии. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2013. Т. 99. № 7. С. 869-875

4. Цыпленкова В.Г, Капелько В.И., Рууге Э.К., Тимошин А.А., Лакомкин В.Л., Коркина О.В. Защитное действие убихинона (коэнзима q10) при ишемии и реперфузии сердца. Кардиология, 2002.-N 12.-С.51-55.

5. Geelen T., Paulis L.E., Coolen B.F., Nicolay K., Strijkers G.J. Passive targeting of lipid-based nanoparticles to mouse cardiac ischemia-reperfusion injury. Contrast Media Mol Imaging. 2013 Mar-Apr;8(2):117-26.

6. Mukhamadiyarov R.A., Veremeev A.V., Khaliulin I.G., Zhouravleva I.Yu. Inclusion and intracellular distribution of liposomes in the myocardium. Journal of international Scientific Publications: Materials, Methods Technologies 2013. V.7. Part 2. P.222-233.

7. Takahama H., Minamino T., Asanuma H., Fujita M., Asai T., Wakeno M., Sasaki H., Kikuchi H., Hashimoto K., Oku N., Asakura M., Kim J., Takashima S., Komamura K., Sugimachi M., Mochizuki N., Kitakaze M. Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. J. Am. Coll. Cardiol. P. 709–717.