

УДК 616-079.1-008.64-612.2:576.08

DOI: 10.22141/2224-0586.1.80.2017.94453

Лоскутов О.А., Пивоварова О.А.

Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика, г. Киев, Украина

Ультраструктурные изменения митохондрий в условиях инсулиновой недостаточности

Резюме. Высокая распространенность сахарного диабета и прогрессирующий рост числа больных, страдающих от органоспецифических диабетических осложнений, заставляют искать факторы, влияющие на изменения метаболических процессов и приводящие к энергетическому дисбалансу и возможным дефектам митохондрий в различных тканях под влиянием инсулиновой недостаточности. Объектом исследования были 52 белые крысы линии Wistar массой $234,00 \pm 2,64$ г в возрасте 5–6 месяцев. I группу составили 25 лабораторных крыс со стрептозотоциновым диабетом, не получающих сахароснижающую терапию. II группа (27 особей) — группа контроля. В результате проведенного электронно-микроскопического исследования миокарда и легочной ткани выявлены ультраструктурные изменения митохондрий в виде дезорганизации и редукции их структур в условиях стойкой декомпенсации углеводного обмена в отличие от группы недиабетических крыс. Это указывает на развитие вторичной митохондриальной недостаточности в миокарде и тканях дыхательной системы при не контролируемой медикаментозно гипергликемии.

Ключевые слова: митохондрии; стрептозотоциновый диабет; электронная микроскопия; миокард; легкие

Введение

Согласно данным ВОЗ, распространенность сахарного диабета в мире к 2025 году составит 299 миллионов заболевших. Однако в 2015 году этот показатель уже превысил прогнозируемый более чем на 100 миллионов человек [1, 2]. Обеспокоенность вызывает прогрессирующий рост числа больных, страдающих от органоспецифических осложнений, обусловленных недостаточным качеством метаболического контроля [3–5]. При всем многообразии факторов, влияющих на изменения метаболических процессов, одним из ведущих остается формирующаяся гипоксия вследствие инсулиновой недостаточности [6–8].

Как предполагают некоторые авторы, в условиях клеточной гипоксии может развиваться энергетический дисбаланс, и наибольший интерес в данном случае представляет изучение изменений, происходящих в митохондриях, так как кислород является одним из основных субстратов для этих клеточных органелл [9–11].

В наше время получены некоторые экспериментальные и клинические доказательства структурно-

биохимических дефектов митохондрий в энергозависимых тканях [12, 13].

Но в то же время на фоне огромного количества исследований нет единого представления о закономерностях и функциональном значении изменений ультраструктуры митохондрий при развитии диабетической патологии, обусловленных дефицитом инсулина, и принципы участия митохондрий в них нельзя считать установленными.

Таким образом, целью исследования являлось изучение динамики изменений в ультраструктурной организации митохондрий миокарда и пульмональной ткани крыс в процессе развития и прогрессирования заболевания на модели экспериментального сахарного диабета (ЭСД).

Материалы и методы

Эксперимент был проведен на 52 белых крысах (самцах) линии Wistar с исходной массой $234,00 \pm 2,64$ г в возрасте 5–6 месяцев. Работу с животными осуществляли согласно положениям «Общих этических принципов экспериментов на животных», принятых I Национальным конгрес-

сом по биоэтике (Киев, 2001), и международным требованиям «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях».

Животные были разделены на следующие группы. I группу составили 25 лабораторных крыс линии *Wistar* с массой тела $230,70 \pm 3,16$ г. У подопытных животных данной группы нами был смоделирован стрептозототиновый сахарный диабет путем однократного внутривентрального введения стрептозототина (*Sigma*, США) в 0,1 М цитратном буфере pH 4,5 в дозе 60 мг/кг. Введение стрептозототина осуществляли после предварительной 24-часовой депривации пищи при сохраненном доступе к воде. С целью формирования полного и стабильного диабета животных содержали на протяжении 11 суток на стандартной диете. Определение глюкозы крови из хвостовой вены проводили глюкозооксидазным методом. Для дальнейшего исследования использовали только особей с повышенным уровнем глюкозы (> 11 ммоль/л).

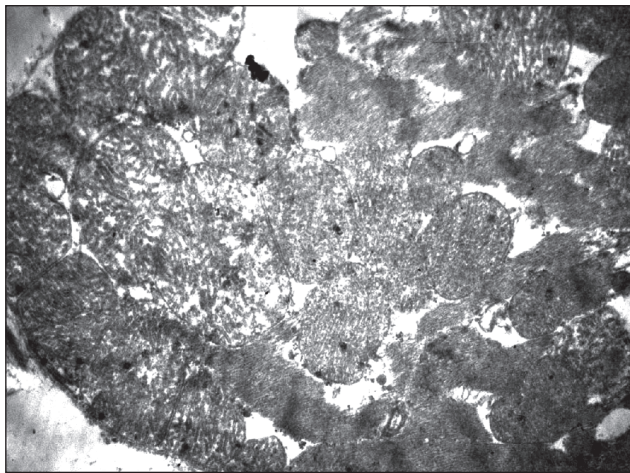


Рисунок 1. Кардиомиоцит с признаками разрушения митохондрий. Электронограмма. Увелич. $\times 25\ 500$

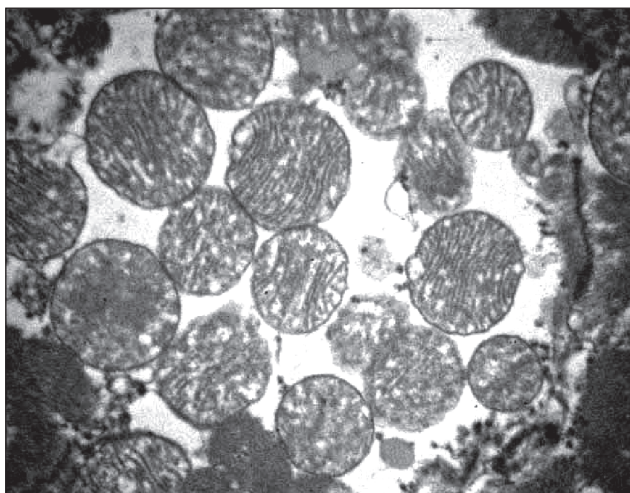


Рисунок 2. Кардиомиоцит с признаками повреждения. Набухание митохондрий с возрастанием величины их среднего диаметра. Электронограмма. Увелич. $\times 25\ 500$

II группу составили подопытные крысы (27 особей) линии *Wistar* с массой тела $228,30 \pm 1,12$ г.

Учитывая стойкие цифры тошаковой гликемии во II группе на уровне $25,7 \pm 1,4$ ммоль/л и прогрессирующее снижение массы тела подопытных грызунов до $186,0 \pm 1,8$ г без получения сахароснижающей терапии, на 18-й неделе животных выводили из эксперимента путем декапитации после предварительной 30-минутной анестезии с помощью ингаляции паров севофлурана.

Фиксацию материала производили немедленно, внося образцы ткани в забуференный 2,5% раствор глутарового альдегида. Дофиксация 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 эпонаралдит (фирмы *Fluka*, Швейцария) проводилась по общепринятой методике [14].

Ультратонкие срезы толщиной 40–60 нм для просмотра в электронном микроскопе контрастировали 1% раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца (реактивы фирмы *Sigma*, США) по методике Рейнольдса [15].

Просмотр препаратов осуществляли с помощью электронного микроскопа ПЕМ-125К (Украина).

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования у лабораторных животных с ЭСД были зафиксированы идентичные ультраструктурные изменения митохондрий в кардио- и альвеолоцитах в виде фрагментации мембран, что, с одной стороны, может свидетельствовать о снижении эффективности работы митохондрий и энергетического потенциала, создаваемого на этих мембранах на фоне стойкой декомпенсации углеводного обмена, а с другой — характеризоваться как защитный ответ клеток, направленный на пре-

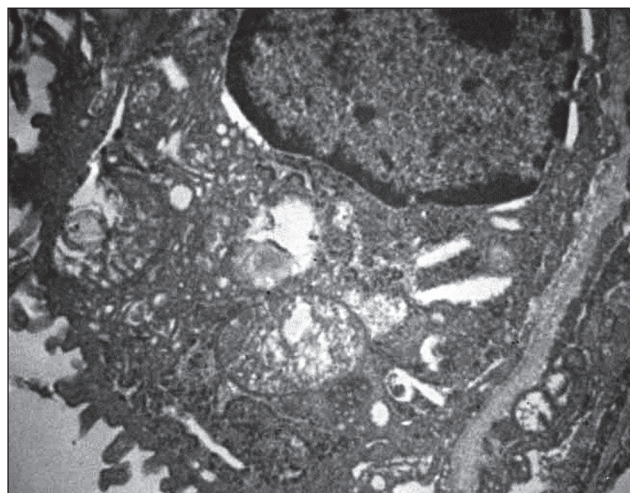


Рисунок 3. Альвеолоцит с признаками митохондриального повреждения. Электронограмма. Увелич. $\times 25\ 500$

дотворщение их гибели, что согласуется с данными других авторов [16, 17].

При дальнейшем анализе в диабетической группе были определены признаки разрушения крист и вакуолизация митохондрий в исследуемых тканях, что подразумевало снижение их функциональной активности и являлось первичным признаком аутолиза клеток при не контролируемой противодиабетическими препаратами гипергликемии в отличие от митохондрий крыс без сахарного диабета (рис. 1).

Следует отметить, что дезорганизация митохондрий наблюдалась в виде х-конденсации и набухания с возрастанием величины их среднего диаметра как в миокарде, так и в изучаемой легочной ткани по сравнению с группой недиабетических крыс (рис. 2, 3).

Именно конденсация и набухание митохондрий, согласно современным представлениям, свидетельствуют о функциональном напряжении клетки вследствие нарастающего кислородного голодания и развития гипоксических процессов в тканях [18, 19].

Стоит отметить, что в ряде препаратов альвеолярной ткани при стрептозотоциновом диабете помимо наличия структурно поврежденных митохондрий определялось отсутствие активации их морфогенеза (рис. 4).

В кардиомиоцитах диабетических крыс также были верифицированы начальные стадии проявлений аутофагии митохондрий с уплотнением митохондриальных мембран и повышением электронной плотности отдельных пространств между кристами (рис. 5).

Выводы

1. В результате проведенного исследования нами получены убедительные доказательства ультраструктурных изменений митохондрий в виде дезорганизации и редукции их структур под влия-

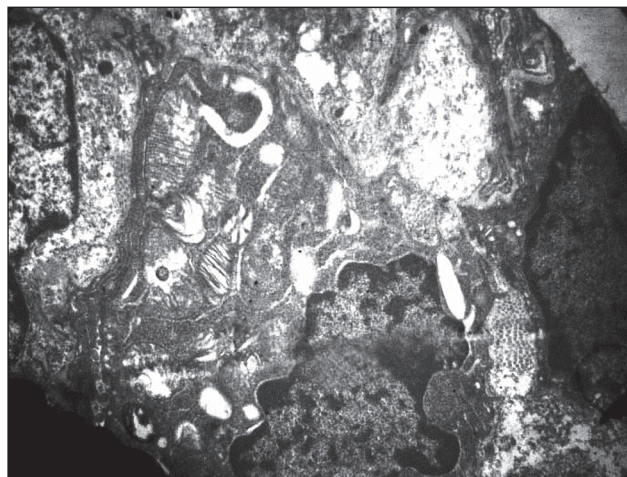


Рисунок 4. Альвеолоцит с признаками структурно поврежденных митохондрий и отсутствием активации морфогенеза. Электронограмма. Увелич. × 25 500

нием инсулиновой недостаточности без сахароснижающего лечения.

2. В условиях экспериментального диабета состояние изучаемых клеточных органелл соответствовало условиям сниженной выработки АТФ, что ограничивало их энергетическую функцию или делало митохондрии в изучаемых тканях энергетически несостоятельными.

3. Полученные нами данные свидетельствовали о том, что при стойкой диабетической декомпенсации наблюдаются нарушения внутриклеточной биоэнергетики, что вызывало нарушения биосинтетических и репаративных процессов на субклеточном уровне и указывало на развитие вторичной митохондриальной недостаточности в миокарде и тканях дыхательной системы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии какого-либо конфликта интересов при подготовке данной статьи.

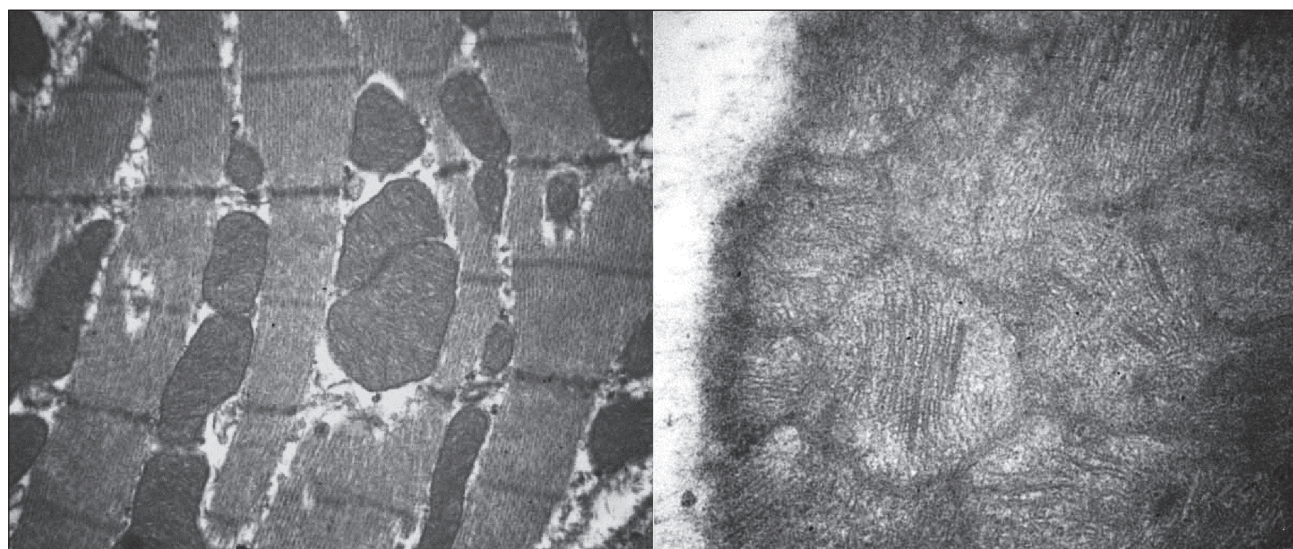


Рисунок 5. Кардиомиоцит с признаками повреждения. Уплотнение митохондриальных мембран. Электронограмма. Увелич. × 25 500

Список литературы

1. Guariguata L. Contribute data to the 6th edition of the IDF Diabetes Atlas // *Diabetes Res. Clin. Pract.* — 2013. — Vol. 100 (2). — P. 280-281.
2. Twig G., Yaniv G., Levine H. et al. Body-Mass Indexin 2.3 Million Adolescents and Cardiovascular Deathin Adulthood // *N. Engl. J. Med.* — 2016. — Vol. 374 (25). — P. 2430-2440.
3. Danaei G., Finucane M.M., Lu Y. et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants // *Lancet.* — 2011. — Vol. 378 (9785). — P. 31-40.
4. Dosluoglu H.H., Lall P., Nader N.D. et al. Insulin use is associated with poor limb salvage and survival in diabetic patients with chronic limb ischemia // *J. Vasc. Surg.* — 2010. — Vol. 51 (5). — P. 1178-1189.
5. Zhou B., Lu Y., Hajifathalian K. et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants // *Lancet.* — 2016. — Vol. 387 (10027). — P. 1513-1530.
6. Wheatley C.M., Baldi J.C., Cassuto N.A. et al. Glycemic control influences lung membrane diffusion and oxygen saturation in exercise-trained subjects with type 1 diabetes: alveolar-capillary membrane conductance in type 1 diabetes // *Eur. J. Appl. Physiol.* — 2011. — Vol. 111 (3). — P. 567-578.
7. Mercer J.R., Liu H. The Evaluation of Hypoxiain Diabetes // *Developments in Nuclear Medicine.* — 1999. — Vol. 33. — P. 129-153.
8. Gomez-Valdes A. Chronic Hypoxia Causes Disorder of Glucose Metabolism and a Specific Type of Diabetes // *Journal of Endocrinology and Diabetes Mellitus.* — Vol. 2 (issue 2). — P. 53-57.
9. Armstrong J.S., Whiteman M. Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria // *Methods Cell. Biol.* — 2007. — Vol. 80. — P. 355-377.
10. Roth M., Black J.L. An imbalance in C/EBPs and increased mitochondrial activity in asthmatic airway smooth muscle cells: novel targets in asthma therapy? // *Br. J. Pharmacol.* — 2009. — Vol. 157 (3). — P. 334-341.
11. Disorders of Mitochondrial Energy Metabolism / Rahman S., Janssen C.H.M. — 2016. // *Oxford Medicine Online*: <http://dx.doi.org/10.1093/med/9780199972135.003.0007>
12. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* — 2007. — Vol. 292 (2). — P. 615-640.
13. Schaible N., Delmotte P., Sieck G.C. Mitochondrial Excitation-Energy Coupling in Airway Smooth Muscle // *Respiratory Medicine.* — 2014. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0829-5_5.
14. Каруну В.Я. Электронная микроскопия / В.Я. Каруну. — К.: Вища школа, 1984. — 208 с.
15. Вейбель Э.П. Морфометрия легких человека / Э.П. Вейбель: Пер. с англ. — М.: Медицина, 1970. — 170 с.
16. Carraro M., Bernardi P. Calcium and reactive oxygen species in regulation of the mitochondrial permeability transition and of programmed cell death in yeast // *Cell. Calcium.* — 2016. — Vol. 60 (2). — P. 102-107.
17. Carraro M., Giorgio V., Šileikytė J. Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition // *J. Biol. Chem.* — 2014. — Vol. 289 (23). — P. 15980-15985.
18. Brooks G.A. Energy Flux, Lactate Shuttling, Mitochondrial Dynamics, and Hypoxia // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2016. — Vol. 903. — P. 439-455.
19. Gonchar O., Mankovskaya I. Effect of moderate hypoxia/reoxygenation on mitochondrial adaptation to acute severe hypoxia // *Acta Biol. Hung.* — 2009. — Vol. 60 (2). — P. 185-194.

Получено 10.12.2016 ■

Лоскутов О.А., Пивоварова О.А.
НМАПО імені П.Л. Шупика, м. Київ, Україна

Ультраструктурні зміни мітохондрій в умовах інсулінової недостатності

Резюме. Висока поширеність цукрового діабету і прогресуюче зростання числа хворих, які страждають від органоспецифічних діабетичних ускладнень, змушують шукати чинники, що впливають на зміни метаболічних процесів і призводять до енергетичного дисбалансу і можливих дефектів мітохондрій у різних тканинах під впливом інсулінової недостатності. Об'єктом дослідження були 52 білі щури лінії *Wistar* масою $234,00 \pm 2,64$ г віком 5–6 місяців. I групу становили 25 лабораторних щурів зі стрептозоточиновим діабетом, які не отримували цукрознижувальної терапії. II група

(27 щурів) — група контролю. У результаті проведеного електронно-мікроскопічного дослідження міокарда та легеневої тканини виявлено ультраструктурні зміни мітохондрій у вигляді дезорганізації і редукції їх структур в умовах стійкої декомпенсації вуглеводного обміну на відміну від групи недіабетичних щурів. Це вказує на розвиток вторинної мітохондріальної недостатності в міокарді і тканинах дихальної системи при не контрольованій медикаментозно гіперглікемії. **Ключові слова:** мітохондрії; стрептозоточиновий діабет; електронна микроскопія; міокард; легені

O.A. Loskutov, O.A. Pivovarova
Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine

The ultrastructural changes of mitochondria under insulin insufficiency

Abstract. The high prevalence of diabetes and the progressive increase in the number of patients suffering from organ-specific complications of diabetes makes us look for factors influencing the change of metabolic processes and leading to energy imbalance and possible defects in the mitochondria in different tissues under the influence of insulin deficiency. The study included 52 white *Wistar* rats weighing 234.00 ± 2.64 g at the age of 5–6 months. Group I consisted of 25 laboratory rats with streptozotocin diabetes not receiving hypoglycemic therapy. II group (27 animals) — control group. As a result of the electron

microscopic examination of the myocardium and lung tissue, we have revealed ultrastructural changes of mitochondria in the form of disorganization and the reduction of their structures in a persistent decompensation of carbohydrate metabolism, in contrast to the group of non-diabetic rats. It indicates the development of secondary mitochondrial insufficiency in the myocardium and tissues of the respiratory system in medically uncontrolled hyperglycemia.

Keywords: mitochondria; streptozotocin diabetes; electron microscopy; myocardium; lungs