

*На правах рукописи*

**Егорова Маргарита Владимировна**

**РОЛЬ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ  
КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ**

03.03.01 – физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

**Томск – 2014**

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ **Медведев Михаил Андреевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет»  
**Айзман Роман Иделевич**

доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры физиологии человека и животных ФГБОУ ВПО НИ «Томский государственный университет»  
**Большаков Михаил Алексеевич**

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии человека и животных и валеологии ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет» **Казин Эдуард Михайлович**

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

Защита состоится 27 июня 2014 г. на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (634050 г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Одной из важнейших проблем современной физиологии является исследование функциональных возможностей миокарда в условиях постоянного или длительного воздействия стрессовых факторов и изучение малоизвестных механизмов повышения устойчивости миокарда к гипоксии, так как распространенность сердечно-сосудистых заболеваний, является общемировой проблемой. Соответственно, изучение и понимание особенностей процессов адаптации миокарда к гипоксии различной этиологии (циркуляторной, тканевой, гипоксии нагрузки и др.) является чрезвычайно важной задачей не только с позиции фундаментальных представлений о процессах адаптации, но и с точки зрения прикладного значения.

По современным представлениям работу сердца определяет сбалансированность метаболизма жирных кислот (Grynberg A., 1999; Brindley D.N. et al., 2010; Lopaschuk G.D., и др., 2010). Основной пул жирных кислот вовлечен преимущественно в энергетические процессы и поддержание мембранного гомеостаза кардиомиоцитов, способствуя, таким образом, нормальной электрофизиологической активности мембран и сохранению сократительной активности миокарда. Однако при чрезмерном поступлении свободных жирных кислот в клетку процессы их нормального окисления нарушаются, и жирные кислоты и/или их продукты становятся инициаторами блокирования окисления глюкозы, увеличения проницаемости плазматической и митохондриальной мембран, разобщения процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях кардиомиоцитов (Оруджева С.А., Звягин А.А., 2006; Стаценко М.Е., Туркина С.В., 2012; Brindley D.N. et al., 2010; Lopaschuk G.D. et al., 2010).

Жирные кислоты как сами по себе, так и посредством изменения структуры мембранных фосфолипидов, могут принимать непосредственное участие в коррекции метаболизма кардиомиоцитов, оказывая разнонаправленное действие в зависимости от собственной концентрации и стадий адаптивного процесса (Ипатова О.М., 2005; Killian J.A., van Meer G., 2001; Hulbert A.J., Rana T., Couture P., 2002; Bracey M.H., Cravatt B.F., Stevens R.C., 2004; Di Paola M., Lorusso M., 2006). Накопление триглицеридов в миокарде, изменение интенсивности окисления жирных кислот и энергетического метаболизма в кардиомиоцитах в современной литературе рассматриваются как возможный механизм защиты миокарда от накопления вредных продуктов обмена (Lavie C.J. et al., 2003; Chandler M.P. et al., 2004; O'Donnell J.M. et al., 2006; Shen X. et al., 2006; Ussher J.R., Lopaschuk G.D., 2006-2009; Shinmura K. et al., 2007; Peterson L. R. et al., 2008; Brindley D.N. et al., 2010). При этом необходимо отметить, что большинство

известных данных о механизмах прямого действия насыщенных и ненасыщенных жирных кислот на митохондриальные процессы получено в экспериментах с митохондриями, выделенными из сердца интактных или геномодифицированных крыс и мышей.

Повышение содержания свободных жирных кислот в крови и увеличение их поступления в клетки миокарда может быть вызвано усилением липолиза в адипоцитах из-за стимулирующего действия стрессорных гормонов и/или уменьшения действия инсулина на жировую ткань, как это наблюдается при сахарном диабете (СД). Нарушение транспорта глюкозы, неспособность митохондрий окислить весь объём поступающих жирных кислот, накопление недоокисленных метаболитов жирных кислот – все это приводит к тому, что, последствия СД для сердечной мышцы даже в условиях её адекватного снабжения кислородом напоминают метаболические нарушения при тяжёлой форме ишемии миокарда (Александров А.А., 2003; Оруджева С.А., Звягин А.А., 2006; Lopaschuk G.D. et al., 2010). Обобщающим звеном нарушения функциональной активности миокарда является развивающаяся тканевая гипоксия, а термином «метаболическая ишемия» стали обозначать комплекс изменений метаболизма кардиомиоцитов, вызванных (или осложненных) СД (Александров А.А., 2003; Оруджева С.А., Звягин А.А., 2006).

Сходство метаболических нарушений в кардиомиоцитах вследствие увеличения циркулирующих свободных жирных кислот при самых разных патологических состояниях (ожирение, СД 1 и 2 типов, ИБС, ХСН) привела в свое время к идее о коррекции липидного обмена в этих условиях. Метаболическая терапия обогатилась целым рядом медикаментов (статины, фибраты, ингибиторы  $\beta$ -окисления жирных кислот и др.), воздействующих практически на все стадии метаболизма липидов. Однако, несмотря на высокий цитопротекторный эффект подобного рода препаратов, в современной литературе развернулась дискуссия о возможных или уже известных нежелательных последствиях вмешательства в липидный метаболизм (Lee L., Horowitz J., Frenneaux M., 2004; Martí Massó J.F., 2004; McCarty M.F., 2004; Masmoudi R. et al., 2005; Lee L. et al., 2005; Sommet A. et al., 2005; Endres M., 2006; Holubarsch C.J. et al., 2007; Lindenfeld J., Masoudi F.A., 2007; Nissen S.E., Wolski K., 2007; Sivert J. et al., 2008; Mouquet F. et al., 2010 и др.). Одной из причин негативных последствий при коррекции липидного метаболизма может быть вмешательство в формирование естественных компенсаторных метаболических реакций с участием жирных кислот при долгосрочной адаптации кардиомиоцитов к тканевой гипоксии, в том числе, в процессе развития ишемического и диабетического поражения миокарда. К тому же, при сопоставлении результатов многочисленных исследований метаболизма сердца пациентов с ИБС и диабетом и животных с экспериментально вызванным

повреждением миокарда обнаружены противоречивые данные об изменении параметров энергетического обмена в кардиомиоцитах на разных сроках формирования ишемического и диабетического поражения миокарда и роли в этом процессе жирных кислот (Lopaschuk G.D. et al., 2010, обзор). В экспериментальных исследованиях неоднократно наблюдалась парадоксально высокая ишемическая резистентность миокарда (*in vivo* и *in vitro*) у животных с небольшим сроком стрептозотоцин-индуцированного диабета (Nawata T., Takahashi N., Opie T., 2002; Chen H., Shen W.L., Wang X.H., 2006; Дубилей Т.А. и др., 2007). Этот феномен может быть как следствием проявлением эффекта кросс-адаптации, так и особенностями регуляции метаболизма кардиомиоцитов в этих условиях.

В связи с вышесказанным является актуальной проблемой определение роли свободных жирных кислот как физиологических регуляторов компенсаторно-приспособительных изменений метаболизма миокарда в условиях хронической гипоксии.

**Цель настоящего исследования** – определение роли свободных жирных кислот в клеточных механизмах долгосрочной адаптации кардиомиоцитов крыс к тканевой гипоксии, вызванной ишемическим повреждением миокарда различной этиологии, в эксперименте.

В соответствии с поставленной целью был определён **комплекс задач**:

1. Модифицировать экспериментальную модель ишемического и диабетического повреждения миокарда *in vivo* для воспроизведения различных вариантов прямого и опосредованного воздействия на метаболизм миокарда и их сочетания, на разных стадиях развития адаптивных реакций.
2. Изучить изменения морфологических параметров миокарда крыс при отдельных и сочетанных экспериментальных воздействиях в динамике развития адаптивных процессов.
3. Изучить изменения метаболических показателей стресс-реакции (гормонов, глюкозы, свободных жирных кислот) в сыворотке крови крыс в динамике развития адаптивных реакций при моделируемых состояниях.
4. Исследовать изменения кислородного запроса в миокарде экспериментальных животных по интенсивности дыхания изолированных кардиомиоцитов в динамике процессов адаптации, в отсутствие и в присутствии насыщенных и ненасыщенных жирных кислот.
5. Исследовать функциональное состояние митохондрий сердца экспериментальных животных по изменению скорости поглощения кислорода изолированными митохондриями в присутствии и отсутствии эндогенных и экзогенных модуляторов их функциональной активности, в динамике развития моделируемых состояний.

6. Установить взаимосвязь между изменениями рассматриваемых показателей и концентрацией свободных жирных кислот в кардиомиоцитах.

**Научная новизна.** Получены принципиально новые данные фундаментального характера о роли свободных жирных кислот в процессах адаптации кардиомиоцитов при хронической метаболической ишемии миокарда. Установлено, что насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты при хронической ишемии миокарда снижают кислородный запрос кардиомиоцитов и оказывают прямое ингибирующее влияние на процессы, приводящие к увеличению проницаемости митохондриальных мембран. Впервые проведено комплексное сравнительное исследование структурных и функциональных изменений миокарда и продемонстрированы их существенные различия при разнообразных временных модификациях сочетания прямого и опосредованного воздействий на метаболизм миокарда. Впервые продемонстрирован эффект перекрестной адаптации при сочетании прямого и опосредованного повреждения миокарда на хронической стадии и показано кардинальное отличие в процессах адаптации при сочетании моделируемых состояний «инфаркт на фоне диабета» и «диабет на фоне инфаркта». Предложены и обоснованы механизмы участия свободных жирных кислот в приспособительных структурно-функциональных изменениях кардиомиоцитов при долгосрочной адаптации.

**Научно-практическая значимость.** Полученные в ходе исследования новые данные о роли свободных жирных кислот в формировании механизмов долговременной адаптации при сочетании стрессовых факторов имеют фундаментальное значение, дополняют и углубляют теоретические представления о механизмах адаптации и стресса. Практическую значимость имеют полученные сведения об изменении структурных и функционально-метаболических изменений миокарда при сочетании прямого и опосредованного повреждения сердца в динамике развития сочетанных состояний для определения направления и коррекции подходов к метаболической терапии комбинированных патологий. Предложенные модификации модели сочетанной патологии *in vivo* могут быть использованы для исследования и дифференцировки механизмов действия лекарственных препаратов при разных вариантах сочетания патологий. Предложенный комплексный анализ морфофункциональных показателей может стать основой для разработки метода диагностики эффективности адаптивных реакций миокарда на разных стадиях развития патологий сердца.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. В динамике развития моделируемых состояний, как при прямом («инфаркт»), так и при опосредованном («диабет») повреждении миокарда, а также при их сочетании, наблюдается нарастание метаболических и структурных нарушений в кардиомиоцитах и содержания свободных жирных кислот в сыворотке крови;

2. Метаболические и структурные изменения миокарда быстро нарастают на ранних стадиях процесса адаптации, как при прямом, так и опосредованном поражении миокарда, а при их комбинировании наблюдается торможение развития патологических процессов в миокарде, в том числе и увеличения концентрации свободных жирных кислот;
3. Проявление эффекта кросс-адаптации при комбинированных воздействиях наблюдается только в том случае, когда повторное стрессовое воздействие возникает на стадии резистентности при адаптации к первому;
4. Насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты снижают скорость потребления кислорода кардиомиоцитами и митохондриями *in vitro*, как при отдельно моделируемых воздействиях, так и их сочетании, на всех стадиях развития процессов адаптации;
5. Свободные жирные кислоты, при прямом воздействии на митохондрии сердца экспериментальных животных, оказывают ингибирующее действие на дыхание митохондрий, аналогичное влиянию эндогенных (АДФ) и экзогенных (циклоспорин А, ЭГТА, карбоксиатрактилат) супрессоров патологических процессов в митохондриях;
6. Изменения уровня циркулирующих СЖК можно рассматривать как необходимый компонент сигнальной системы в триггерном механизме процессов долгосрочной адаптации сердца, в том числе при хронической ишемии миокарда.

**Апробация и внедрение результатов работы.** Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на V Сибирском физиологическом съезде с международным участием (Томск, 2005); научно-практической конференции «Современная кардиология: наука и практика» (Санкт-Петербург, 2007); первом и втором съездах кардиологов Сибирского федерального округа (Томск, 2005, 2007); научных конференциях с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии» (Томск, 2007, 2009); региональной научно-практической конференции «Вопросы интегративной физиологии» (Красноярск, 2007); Российском национальном конгрессе кардиологов и конгрессе кардиологов стран СНГ «Кардиология без границ» (Санкт-Петербург, 2007); XIII Всероссийского съезде сердечно - сосудистых хирургов (Москва, 2007); XI и XII научно-практических конференциях «Актуальные проблемы медицины» (Абакан, 2008, 2011); 5-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2011); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания. Современные подходы к

диагностике и лечению» (Томск, 2012); Всероссийской научной конференции «Противоречия современной кардиологии: спорные и нерешенные вопросы» (Самара, 2012); VII Сибирском съезде физиологов (Красноярск, 2012); XXI и XXII съездах Физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2011; Волгоград, 2013).

Исследования поддержаны грантом РФФИ №07-04-01195а "Механизмы дисфункций саркоплазматического ретикулула кардиомиоцитов при диабетическом поражении миокарда человека" (2007-2009); Государственным контрактом в рамках ФНЦТП: "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 гг" по теме: "Изучение молекулярно-клеточных механизмов сердечных заболеваний, ассоциированных с диабетом и избыточным весом" (ГК № 02.527.11.0007); совместным проектом Россия – Евросоюз HEALTH-2008-4.3.3.2 №241558 «Механизмы сердечной недостаточности при сочетании диабета и ожирения» в рамках 7-ой Рамочной программы научных исследований и технологических разработок Европейского союза по направлению "SICA-HF" (Studies Investigating Co-morbidities Aggravating Heart Failure).

Основные результаты диссертационного исследования включены в лекционный курс по нормальной физиологии (разделы «Физиология сердечно-сосудистой системы», «Физиология адаптивных процессов») для студентов врачебных факультетов ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

#### **Публикации.**

По теме диссертации опубликовано 42 печатные работы, из них – 18 научных статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 3 – в зарубежных рецензируемых журналах, цитируемых в базах данных Scopus, Web of Science и Web of Knowledge, 1 монография в соавторстве, 1 патент РФ на изобретение.

#### **Структура и объём работы.**

Диссертация изложена на 205 страницах машинописного текста, включает в себя введение, обзор литературы, методический раздел, результаты и их обсуждение, заключение и выводы, библиографический список, содержащий 346 наименований на русском (91) и иностранных (255) языках, проиллюстрирована 11 таблицами и 21 рисунком.

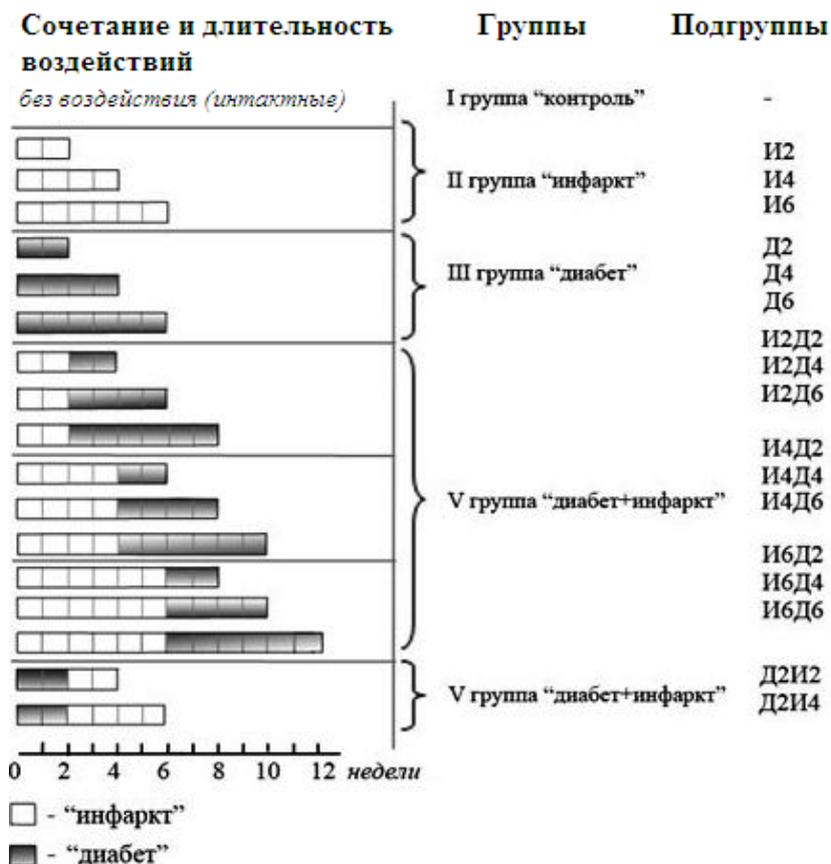
#### **Личный вклад автора.**

Личный вклад автора в получении научных данных, изложенных в диссертации, состоит в теоретическом обосновании проблемы, определении направления исследований, разработке некоторых методов исследования, организации и проведении экспериментов. Автором самостоятельно проведен научный анализ полученных результатов и их обсуждение, сформулированы выводы и положения, выносимые на защиту.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основная часть экспериментальных исследований выполнена на базе лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики (зав. – д-р мед. наук, профессор С.А. Афанасьев) ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН, а также на базе лабораторий и кафедр ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, ФГБУ ИТЭБ РАН и ФГУП «НПО Вирион».

Исследования проведены на половозрелых крысах-самцах одного возраста (250-300 г) линии Вистар (340 крыс). Были сформированы следующие группы: I группа - контроль - интактные животные; II группа - животные после моделирования прямого повреждения миокарда (инфаркт миокарда); III группа - животные после моделирования опосредованного поражения сердца (стрептозотоцин-индуцированный диабет); IV группа – постинфарктные животные с диабетом; V группа – животные, у которых после индукции диабета вызывали инфаркт миокарда (рис. 1).



*Рисунок 1 Вариации длительности и сочетаний прямого («инфаркт») и опосредованного («диабет») экспериментальных воздействий: обозначение групп и подгрупп в них.*

Для исключения из исследования крыс с низкой устойчивостью к гипоксии (Лукиянова Л.Д., 2000), животных брали в исследование не ранее, чем через 2 недели после моделирования патологии.

Моделирование прямого повреждения сердца проводили вызванным инфарктом миокарда вследствие перевязки левой коронарной артерии (Кондратьева Д.С. и др., 2005). Верификацию постинфарктных изменений осуществляли морфологически. Опосредованное повреждение миокарда вызывали индукцией сахарного диабета однократным введением стрептозотоцина («Sigma», США) в дозе 60 мг/кг внутривенно, разведенного 0,01 моль/л цитратным буфером (рН 4,5) (Дубилей Т.А. и др., 2007). Верификацию стрептозотоцин-индуцированного диабета осуществляли по увеличению концентрации глюкозы в крови крыс в 3-4,5 раза, снижению массы тела, развитию полиурии и полидипсии.

Комбинированное воздействие осуществляли сочетанием технологий моделирования инфаркта миокарда и стрептозотоцин-индуцированного диабета (Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С., Попов С.В., 2012). В настоящей работе исследование экспериментальной модели комбинированного воздействия проводили в двух модификациях: а) предшествование прямого воздействия («инфаркт») опосредованному («диабет»), б) предшествование опосредованного воздействия («диабет») прямому («инфаркт») (рис. 1). При этом в двух предлагаемых модификациях были выделены подгруппы, с различной длительностью используемых воздействий (рис. 1):

1 вариант: Через 2, 4 и 6 недель после коронароокклюзии животным вводили стрептозотоцин и исследовали материал через 2, 4 и 6 недель после моделирования диабета. Таким образом, сформировали 9 подгрупп IV экспериментальной группы (рис. 1);

2 вариант: Аналогичным образом были сформированы 9 подгрупп V экспериментальной группы, в которых введение стрептозотоцина предшествует коронароокклюзии. Однако по причине высокой смертности животных в этой экспериментальной модели для исследования удалось получить только две подгруппы животных (рис. 1).

Кардиомиоциты получали путем непрерывной перфузии сердца комбинацией протеолитических ферментов, используя собственную модификацию метода ферментативного получения изолированных кардиомиоцитов (Егорова М.В., Афанасьев С.А., Попов С.В., 2005). В качестве среды инкубации использовали Кребс-Хенслайт буфер, содержащий (в мМ): 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,25  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 1,3  $\text{MgSO}_4$ , 10 глюкозу, 2  $\text{CaCl}_2$ , 10 HEPES, рН 7,4.

Митохондрии из клеток сердечной мышцы животных получали стандартным методом дифференциального центрифугирования (Pallotti F., Lenaz G., 2001) в сахарозной среде, содержащей: 250 мМ сахарозу, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ HEPES, рН 7,4. Для исследования митохондрии суспендировали и хранили в 250 мМ растворе сахарозы, 10 мМ HEPES, рН 7,4. В качестве среды инкубации

использовали раствор, содержащий: 300 мМ сахарозу, 10 мМ КСl, 5 мМ  $\text{KН}_2\text{PО}_4$ , 1,2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ ЭГТА, 5 мМ сукцинат, 5 мМ НЕРЕС (рН 7,4).

Скорость поглощения кислорода кардиомиоцитов и митохондрий сердца определяли полярографически, с помощью электрода Кларка, с использованием анализатора кислорода АКПМ-02 (Альфа БАССЕНС, Россия). Добавки в среду инкубации: АДФ - 200 мкмоль/л; жирные кислоты, арахидоновая (АК) и пальмитиновая (ПК) - по 20 мкмоль/л;  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофор А23187 – 0,2 мкг/мл (в комбинации с 1 ммоль/л ЭГТА, хелатором  $\text{Ca}^{2+}$ ); ингибитор фосфолипазы  $\text{A}_2$ , бромфенацилбромид (БФБ) – 15 мкмоль/л; ингибитор АТФ/АДФ-антипортера в митохондриях, карбоксиатрактитат (кАтр) – 2 мкмоль/л; активатор фосфолипазы  $\text{A}_2$ , мелитин – 0,5 мкг/мл; ингибитор протонного канала АТФ-синтетазы в митохондриях, олигомицин – 2 мкг/мл; ингибитор комплекса I дыхательной цепи митохондрий, ротенон, – 5 ммоль/л; ингибитор неспецифической поры МРТР в митохондриях, циклоспорин А – 2 мкг/мл.

Содержание свободных жирных кислот в сыворотке крови [ $\text{СЖК}_{\text{сыв}}$ ] и суспензии митохондрий [ $\text{СЖК}_{\text{мх}}$ ] определяли фотоколориметрически, ферментативным методом Триндера с использованием коммерческого набора фирмы DiaSys Diagnostic Systems (Германия).

Белок в суспензии клеток, митохондрий и в сыворотке крови определяли методом Лоури (Lowry O.H. et al., 1951).

Концентрацию глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом, с помощью глюкометра One Touch Ultra Easy (LifeScan, США).

Уровень гормонов (АКТГ, кортизол, инсулин), миоглобина и Bcl-2 в сыворотке крови оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью стандартных наборов в строгом соответствии с инструкциями производителей. Использовали коммерческие наборы производства Biomerica (США), ХЕМА (Россия), Cusabio Biotech (Китай), Usen Life Science (США). Измерения показателей проводили на спектрофотометре планшетного формата Multiskan FC (Thermo Scientific, США).

Для морфологического исследования у животных II, IV и V групп использовали фрагменты сохранного миокарда левого желудочка примыкающего к рубцовой зоне. У животных I и III групп образцы брали из анатомически сопоставимых участков. Образцы фиксировали в 10% нейтральном формалине. Осуществляли стандартную гистологическую проводку в спиртах и заливку материала в парафин. Готовили серийные срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по методу Ван Гизона. Для оценки состояния васкуляризации миокарда использовалась окраска полученных срезов с помощью метенамина серебра (набор реагентов P.A.S.M.).

Параллельно из вышеуказанных участков миокарда проводили забор материала для электронной микроскопии. Образцы фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом, затем в 1% растворе четырехоксида осмия, дегидратировали в этиловых спиртах возрастающей концентрации и заливали в арадилат. Ультратонкие срезы толщиной 30-60 нм готовили на ультратоме «Ultratom 111» (Швеция). Полученные срезы наносили на сетки с формваровым покрытием и контрастировали 2% уранилацетатом и цитратом свинца.

Микроскопическое исследование срезов на светооптическом уровне выполняли, используя бинокулярный микроскоп «AxioLab A1» («Carl Zeiss», Германия). Методом трансмиссионной электронной микроскопии исследовали кардиомиоциты для выявления изменений в ультраструктуре митохондрий и миофибрилл. Полученные препараты исследовали с помощью электронного микроскопа «JEM-100CX11» («JEOL», Япония) с апертурной диафрагмой 25-30 мкм при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Для гистоэнзимологического исследования в криостате TP-OM-5-01 (Россия) из замороженного миокарда левого желудочка крыс готовили срезы толщиной 10 мкм. На срезах проводили гистохимические реакции по выявлению активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) (Ллойд З., 1982). Количественную оценку активности ферментов производили, используя флуоресцентный микроскоп ЛЮМАМ-ИЗ (Россия), в проходящем свете с длиной волны 546 нм, в зондах площадью 0,5 мкм<sup>2</sup> (СДГ и ЛДГ) и 0,1 мкм<sup>2</sup> (ЩФ).

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез (Гланц С., 1999). Для каждой выборки вычисляли средневыворочные характеристики: среднее арифметическое (M), среднее квадратичное отклонение (SD), ошибку средней (m) или рассчитывали медиану (Me), первый и третий квартили (Q1;Q3). Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Вилка. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выворочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением, для оценки различий между зависимыми выборками, применяли непараметрический критерий Вилкоксона. Для оценки значимости различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни. При статистической обработке полученных данных проводили корреляционный анализ с использованием критерия Спирмена и применяли однофакторный дисперсионный анализ. Различия считались достоверными при уровне

значимости  $p < 0,05$ . Статистическая обработка проводилась с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 6.0.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Сравнительный анализ структурных изменений миокарда у модельных животных**

Изучение адаптивных реакций сердца в настоящем исследовании предполагало рассмотрение структурно-метаболических изменений миокарда в динамике развития не столько отдельных моделируемых патологий, сколько при их сочетании в разной последовательности. Такое исследование представляется обоснованным с той точки зрения, что эффективность адаптивных процессов при прямом воздействии на миокард может ограничиваться локальными процессами в сердце, в то время как опосредованное сложным ансамблем функционально-метаболических изменений на уровне целого организма поражение миокарда при диабете предполагает доминирование центральных механизмов адаптации. Другими словами, не исключена возможность включения разных механизмов адаптации при развитии отдельных и сочетанных моделируемых состояний. В этом плане структурно-метаболические изменения при отдельных вмешательствах служат скорее своего рода контролем для сравнения с процессами, протекающими при комбинированном поражении миокарда.

Моделирование патологий неизбежно сопровождалось гибелью животных, примерно одинаковой при отдельных и сочетанных состояниях в первые дни после воздействия. Однако затем было обнаружено, что среди выживших животных с раздельными патологиями в дальнейшем наблюдались лишь единичные случаи гибели крыс на всем протяжении исследования. При комбинированном воздействии наблюдалась иная картина: вариант «диабет+инфаркт» характеризовался более агрессивным течением в сравнении с сочетанием «инфаркт+диабет». Максимальная выживаемость животных с исходным диабетом была ниже минимальной у животных с обратной последовательностью комбинирования воздействий. При этом нужно отметить, что уровень глюкозы в сыворотке крови сохранялся примерно на одинаково высоком уровне во всех экспериментальных группах с диабетом (табл. 1).

Таким образом, очевидно, что разная выживаемость в обеих сериях обусловлена не столько гипергликемией, сколько способностью организма противостоять патологическому состоянию.

Уровень глюкозы в крови, масса тела и показатели гипертрофии миокарда у животных в экспериментальных группах (Ме (Q1;Q3))

подгруппы	глюкоза, ммоль/л	масса тела, г	масса сердца/масса тела, мг/г	масса ЛЖ/масса сердца, мг/мг
<b>I группа – «контроль»</b>				
-	7,4 (7,3;7,75)	272 (251; 345)	3,3 (3,1;3,4)	0,54 (0,52;0,57)
<b>II группа – «инфаркт»</b>				
И2	7,7 (6,9;8,5)	287 (275;298)	4,5 (4,3;4,9)*	0,60 (0,58;0,61)*
И4	7,9 (7,9;7,9)	300 (298;318)	5,3 (4,4;5,5)*	0,62 (0,61;0,63)*
И6	8,9 (8,4;10,7)	314 (310;315)*	5,7 (4,9;6,4)*	0,63 (0,60;0,65)*
<b>III группа – «диабет»</b>				
Д2	23,1 (23,0;25,1)*	172 (171;180)*	2,9 (2,7;2,9)	0,60 (0,58;0,63)
Д4	30,0 (27,4;31,7)*	187 (179;236)*	3,1 (2,7;3,2)	0,60 (0,59;0,63)*
Д6	29,4 (29,0;32,5)*	184 (183;206)*	3,4 (3,3;3,6)	0,57 (0,56;0,60)
<b>IV группа – «инфаркт+диабет»</b>				
И2Д2	33,3 (28,4;33,3)*	283 (258;296)*	3,2 (3,0;3,3)	0,57 (0,56;0,58)
И2Д4	30,1 (19,2;31,2)*	294 (274;300)	3,6 (3,5;3,8)	0,60 (0,57;0,62)
И2Д6	27,4 (24,1;31,2)*	234 (184;296)	4,2 (3,8;4,4)	0,60 (0,58;0,63)*
И4Д2	27,4 (26,3;29,4)*	224 (218;228)*	3,2 (3,1;3,4)	0,57 (0,56;0,60)
И4Д4	31,5 (30,5;33,3)*	257 (223;272)	3,3 (3,0;3,3)	0,57 (0,55;0,61)
И4Д6	33,3 (33,3;33,3)*	222 (206;252)*	4,3 (4,0;5,4)*	0,59 (0,56;0,60)
И6Д2	32,5 (29,2;33,3)*	207 (184;209)*	3,2 (3,1;3,2)	0,57 (0,55;0,58)
И6Д4	26,9 (26,2;29,4)*	206 (179;218)*	4,3 (3,7;4,9)*	0,57 (0,56;0,59)
И6Д6	33,1 (30,3;33,2)*	215 (207;222)	4,3 (3,8;4,7)*	0,63 (0,58;0,67)*
<b>V группа «диабет+инфаркт»</b>				
Д2И2	31,5 (30,3;33,2)*	210 (200;226)*	3,7 (3,5;3,8)*	0,63(0,61;0,66)*
Д2И4	28,0 (27,3;28,5)*	207 (189;220)*	3,7 (3,4;3,9)*	0,62(0,61;0,64)*

Примечание. \* - различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю.

Эти наблюдения привели к предположению, что такая реакция на разную последовательность сочетания патологий обусловлена разными адаптационными механизмами при прямом и опосредованном поражении сердца. Резкое нарушение кровоснабжения и инфаркт миокарда может предполагать активацию специфических для данного органа защитных реакций. Возможно, острая ишемия миокарда вследствие коронароокклюзии запускает в сердце генерализованную реакцию долгосрочной адаптации, процессы которой разворачиваются за определенный временной период и достигают максимальной мощности к стадии сформированного постинфарктного кардиосклероза. Напротив, постепенное нарастание метаболических изменений в кардиомиоцитах при развитии диабета приводит к хорошо известной в физиологии реакции привыкания, то есть отсутствию реакции на медленно нарастающий по силе раздражитель. Здесь

нужно отметить, что, как будет показано в этом и последующем разделах, дальнейшие исследования подтвердили справедливость высказанного предположения.

Хроническая гипергликемия сопровождалась истощением животных в группе «диабет»: в среднем крысы теряли в весе от 30 до 50% по отношению к контрольным животным (табл. 1). В группах комбинированного воздействия также наблюдалось истощение животных, однако снижение массы тела было менее выражено как в сравнении с животными в контрольной, так и в III группе, независимо от последовательности и сроков моделируемых состояний (табл. 1). Наименьшая потеря массы тела наблюдается в IV группе, хотя и прослеживается тенденция к истощению во времени (табл. 1).

Гипертрофию миокарда определяли по соотношению масса сердца/масса тела и масса ЛЖ/масса сердца. Выраженная гипертрофия миокарда наблюдалась во II группе, то есть на стадии морфологически сформированного постинфарктного кардиосклероза (подгруппа Иб). В III группе признаков гипертрофии миокарда выявлено не было. В группах комбинированного воздействия на всех сроках наблюдается менее выраженная гипертрофия миокарда, как в IV, так и в V группах (табл. 1). Развивающаяся гипертрофия миокарда, несомненно, имеет положительное значение, поскольку позволяет сохранить функцию органа, несмотря на заболевание – хорошо известная в клинике стадия компенсации. При дальнейшем развитии патологического процесса в органе возникают дистрофические изменения, происходит ослабление функции и, в конечном счете, когда адаптационные возможности исчерпаны, наступает стадия декомпенсации и гибели организма.

Для ответа на вопрос, насколько серьезными являются структурные изменения миокарда у модельных животных при рассматриваемых патологиях, было проведено морфологическое исследование срезов миокарда и изолированных кардиомиоцитов на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях.

Типичный вид миокарда крыс контрольной группы и модельных животных представлен на рис. 2. Показано, что по сравнению с контрольными животными для миокарда крыс II и III экспериментальных групп характерны разобщенность, частичная фрагментация и неупорядоченность расположения мышечных волокон. В клетках отмечены дегенеративные изменения: глыбчатый распад цитоплазмы миоцитов, миоцитоллиз, миоцитоллизис. У интактных животных признаки миоцитоллизиса зафиксированы не были, наблюдались слабо выраженные признаки миоцитолиза и глыбчатого распада. В группах II и III была отмечена наибольшая степень выраженности миоцитолиза и миоцитоллизиса.

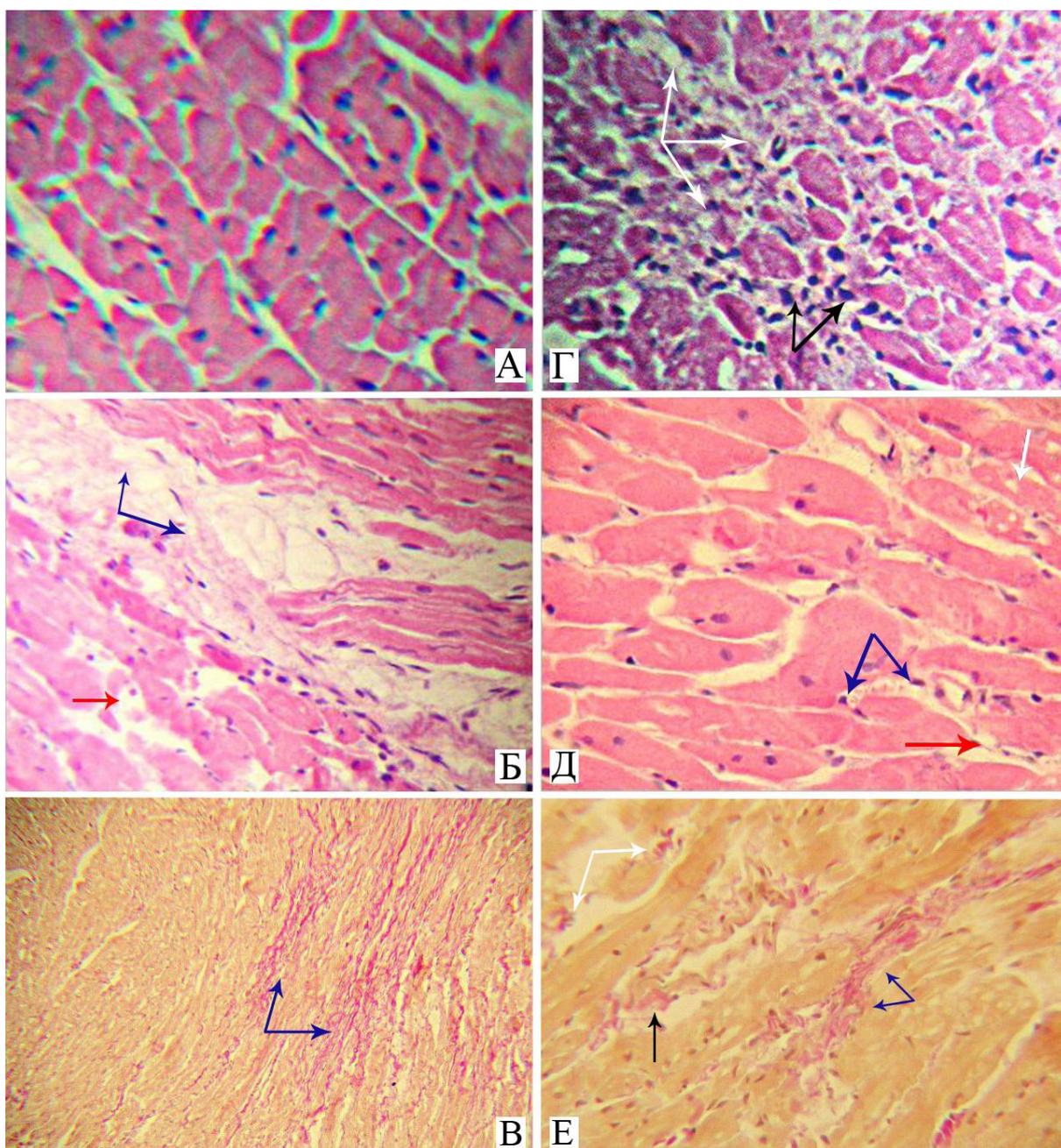
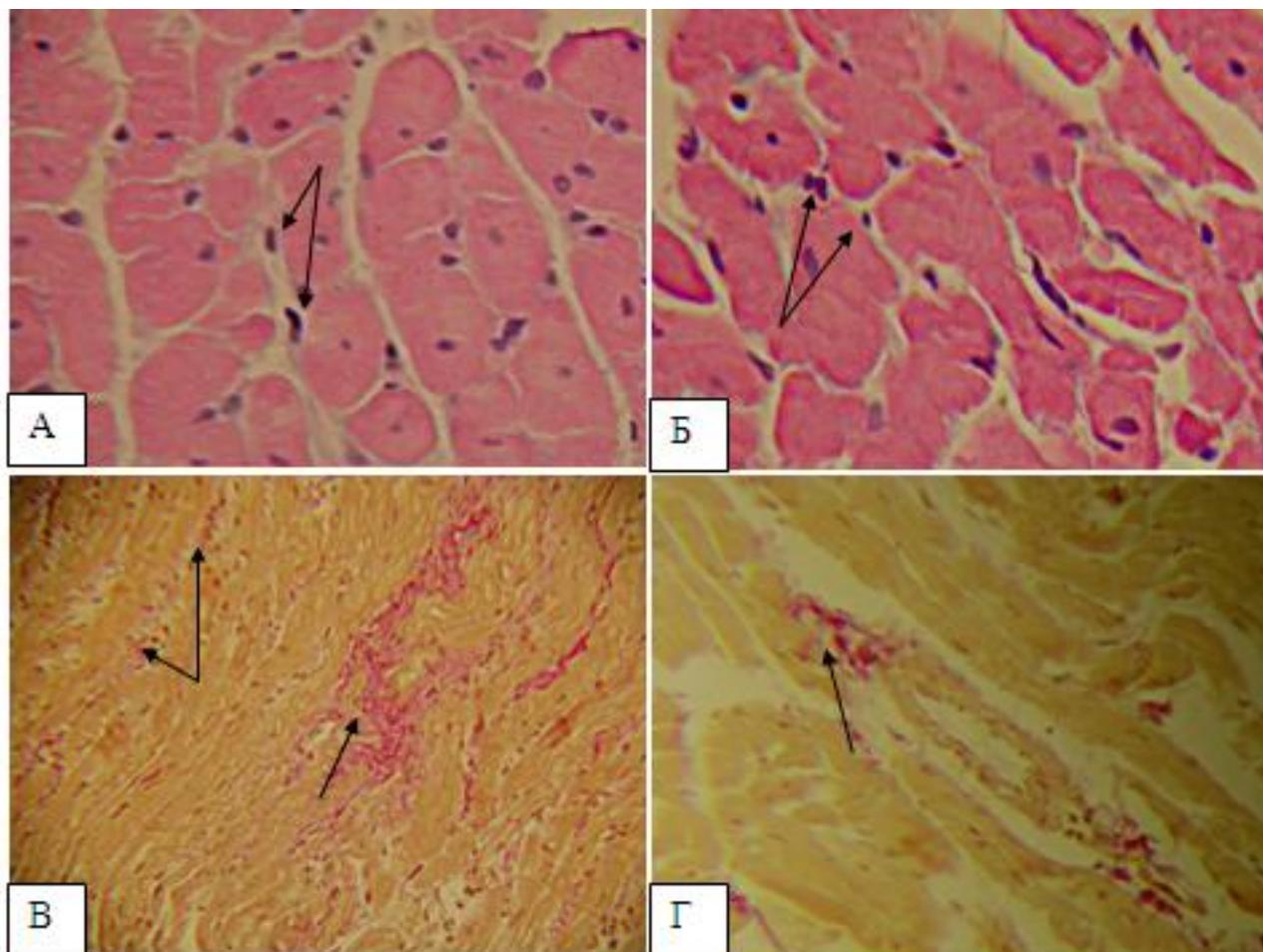


Рисунок 2 Структура миокарда левого желудочка контрольного (А), постинфарктного (Б, В, Г) и диабетического (Д, Е) сердца крысы

- А. I группа, интактный миокард (гематоксилин-эозин, x400);  
 Б. II группа, диффузный фиброз стромы миокарда (синие стрелки), миоцитоллиз мышечных волокон (красная стрелка) (гематоксилин-эозин, x200);  
 В. II группа, диффузный фиброз стромы миокарда (синие стрелки) (пикрофуксин, x100);  
 Г. II группа, мелкоочаговый фиброз стромы миокарда (белые стрелки), мононуклеарная инфильтрации (черные стрелки) (гематоксилин-эозин, x200);  
 Д. III группа, слабо выраженная мононуклеарная инфильтрация стромы миокарда (синие стрелки), вакуолизация цитоплазмы кардиомиоцитов (белая стрелка), миоцитоллиз мышечных волокон (красная стрелка) (гематоксилин-эозин, x 400);  
 Е. III группа, диффузный (белые стрелки) и мелкоочаговый (синие стрелки) фиброз стромы миокарда, периваскулярный фиброз (черная стрелка) (пикрофуксин, x400).

В группах комбинированного воздействия эти показатели были выражены гораздо меньше, чем во II или III группах. В IV и V группах в миокарде отмечалось более упорядоченное и компактное расположение пучков мышечных волокон (рис. 3).



*Рисунок 3 Структура миокарда левого желудочка при комбинированном воздействии, в IV (А, В) и V (Б, Г) группах*

А. IV группа «инфаркт+диабет», слабо выраженная мононуклеарная инфильтрация стромы миокарда, отсутствие выраженности дегенеративных изменений кардиомиоцитов (гематоксилин-эозин, x400);

Б. V группа «диабет+инфаркт», слабо выраженные мононуклеарная инфильтрация стромы миокарда и миоцитоллиз мышечных волокон (гематоксилин-эозин, x400);

В. IV группа, слабо выраженный диффузный и мелкоочаговый фиброз стромы миокарда (пикрофуксин, x100);

Г. V группа, слабо выраженный периваскулярный фиброз (пикрофуксин, x200).

Диффузный и мелкоочаговый фиброз стромы миокарда, а также периваскулярный фиброз в миокарде крыс с сочетанной патологией были выражены слабо (рис. 3, Б-В) и регистрировались в половине случаев.

Мононуклеарная инфильтрация стромы миокарда также была обнаружена лишь в половине случаев наблюдения и характеризовалась меньшей выраженностью, чем в группах с монопатологиями (рис. 3).

В обеих (IV и V) группах комбинированного воздействия в миокарде крыс не было обнаружено признаков глыбчатого распада миоцитов. Во II и III группах отмечались признаки полиморфизма ядер, утрата кардиомиоцитами поперечной исчерченности и матовость цитоплазмы (рис. 2, Б-Е). В условиях комбинированного воздействия, в IV и V группах, дегенеративные изменения кардиомиоцитов характеризовались меньшей степенью выраженности (рис. 3).

Выявленные различия в морфологических параметрах сердца при разных моделируемых состояниях и их сочетании могут быть обусловлены тем, что компенсаторно-приспособительные процессы в миокарде сочетают деструктивные изменения с регенераторными реакциями (Пауков В.С., Фролов В.А., 1982; Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Непомнящих Г.И., 1986). Возможно, что наблюдаемые структурные различия обусловлены разной активностью процессов ангиогенеза и, соответственно, интенсивностью кровообращения миокарда. Для проверки этого предположения было проведено исследование васкуляризации левого желудочка путем подсчета количества капилляров в 1 см<sup>2</sup> миокарда (табл. 2).

Таблица 2

Количество капилляров в 1 см<sup>2</sup> миокарда левого желудочка сердца крыс разных экспериментальных групп (M±SD)

Группы животных					Сравнение в группах
Контроль	Инфаркт (П6)	Диабет (Д6)	Инфаркт+диабет (П4Д2)	Диабет+инфаркт (Д2П4)	
I	II	III	IV	V	
5300±878	10174±980	13130±1235	11044±697	12870±500	I-(II-V) p<0,01 II-III p<0,01 II-V p<0,01 III-IV p=0,02 IV-V p<0,05 <b>p&lt;0,05</b>

Наименьшее количество капилляров обнаружено у животных контрольной группы, наибольшее – в III и V группах (табл. 2). Во II и IV группах увеличение количества капилляров было несколько меньше, однако и в этих случаях данный показатель почти в два раза превышал контрольные значения (табл. 2).

Полученные данные означают, что и прямое, и опосредованное воздействия на миокард модельных животных действительно инициирует статистически значимое усиление васкуляризации миокарда. При комбинированном воздействии, в IV и V группах, плотность микроциркуляторного русла в миокарде выше, чем в II группе. Можно

предположить, что улучшение васкуляризации миокарда во II и III группах развивается за счет активации разных эндогенных механизмов. Возможно, что в группе «инфаркт» менее выраженная васкуляризация миокарда обусловлена локальным повреждением сосудистого русла, вызванного перевязкой коронарной артерии, и, соответственно, формированием коллатералей в обход поврежденного участка (Сисакян А.С. и др., 2008; Fukuda S., 2004). Для диабета 1 типа характерны выраженные мультиорганные микроангиопатии (Юшков П.В., Опаленов К.В., 2001), что обеспечивает включение центральных механизмов ангиогенеза и максимально выраженную реакцию в группе «диабет». Косвенным подтверждением этого предположения является тот факт, что в группах комбинированного воздействия, при сочетании в любой последовательности, не наблюдается усиления ангиогенеза в сравнении с III группой, но при этом плотность капилляров выше, чем в II группе (табл. 2).

Таким образом, проведенное исследование показало, что в рассматриваемых экспериментальных условиях, при моделировании как прямого, так и опосредованного поражения сердца, в миокарде наблюдаются сходные структурные изменения. Однако при комбинированном воздействии структурные нарушения миокарда на аналогичных сроках развития патологий оказываются менее выраженными, что, видимо, и определяет повышенную сопротивляемость миокарда животных и сохранение инотропной функции сердца в этих условиях. Обнаруженные изменения в структуре и васкуляризации миокарда, очевидно, являются следствием перестройки метаболического аппарата кардиомиоцитов.

### **Регуляторная роль свободных жирных кислот в поддержании мембранного гомеостаза клеток сердца при экспериментальной ишемии миокарда**

Нарушения в структуре и функциях мембран кардиомиоцитов наблюдаются при состояниях, сопровождающихся накоплением жирных кислот или их производных в тканях сердца, в том числе, при ишемии миокарда и СД (Александров А.А., 2003; Ventura-Clapier R., Garnier A., Veksler V., 2003; Lopaschuk G.D. и др. 2010). Одним из универсальных процессов поддержания мембранного гомеостаза при различных нарушениях метаболизма, являются реакции деацилирования/реацилирования, с участием фосфолипаз. В ответ на изменение концентрации и соотношения жирных кислот происходит реорганизация липидного состава мембраны с целью создания оптимальных условий для сохранения функциональной активности внутриклеточных органелл и клетки в целом (Grynberg A., 1999).

При обзоре литературы не обнаружено исследований, в которых проводилось бы изучение прямого влияния свободных жирных кислот на

клеточное дыхание и рассматривались бы последствия накопления жирных кислот в миокарде на его метаболизм в динамике развития процессов адаптации при моделируемых в настоящей работе воздействиях. К тому же, на фоне основной массы экспериментальных исследований относительно редко рассматриваются процессы в миокарде при сочетании патологий в хроническом эксперименте. Исходя из этих соображений, представляется важным изучить прямое влияние свободных жирных кислот на поглощение кислорода изолированными клетками и митохондриями сердца на разных стадиях адаптации при прямом, опосредованном и комбинированном воздействии на миокард.

### **Влияние свободных жирных кислот на скорость поглощения кислорода митохондриями сердца**

При исследовании свободного окисления в митохондриях сердца обнаружено, что во всех экспериментальных группах, в сравнении с контролем, наблюдается увеличение скорости потребления кислорода при свободном окислении сукцината, причем интенсивность потребления кислорода нарастает во времени (табл. 3). В сравнении с группами комбинированного воздействия (IV и V) более выраженный прирост скорости потребления кислорода во времени наблюдается в II и III группах, при этом в III группе этот процесс более быстрый, чем во II (табл. 3).

Такое увеличение потребления кислорода может быть обусловлено утечкой протонов через мембрану митохондрий, следствием чего является нарушение в сопряжении окисления и фосфорилирования. Действительно, сопоставление скорости дыхания при свободном окислении и в присутствии АДФ (дыхательный контроль) показало, что при рассматриваемых состояниях наблюдается разобщение процессов окисления и фосфорилирования во всех группах, начиная с ранних стадий (табл. 3).

Наблюдаемое изменение дыхательного контроля сопровождалось параллельным увеличением содержания свободных жирных кислот в сыворотке крови (табл. 3). Увеличение скорости свободного дыхания и содержания жирных кислот в сыворотке крови плавно нарастает в зависимости от длительности моделируемого состояния (табл. 3). Обращает на себя внимание тот факт, что в группах комбинированного воздействия процесс изменений в величинах изучаемых параметров замедлен в 1,5 – 2 раза. Другими словами, изменения, которые наблюдаются во II или III группе в 6 недель, в IV группе развиваются лишь к 8-12 неделям (табл. 3).

Изменения скорости поглощения кислорода митохондриями сердца и концентрации свободных жирных кислот в сыворотке крови крыс ( $M \pm m$ )

Подгруппы	Скорость потребления кислорода, нмоль в мин на мг белка					[СЖК] <sub>сыв</sub> , ммоль/л
	Свободное окисление (в скобках - дыхательный контроль)	Добавки				
		Арахидо- новая кислота	Пальми- тиновая кислота	Бромфена- цилбромид		
<b>I группа – контроль</b>						
-	26,5±1,9	(3,5 ±0,05)	45,2±3,8#	48,8±2,9#	24,9 ±3,8	0,33±0,1
<b>II группа – «инфаркт»</b>						
И2	76,0±1,9*	(1,9 ±0,08*)	40,8±0,5#	38,6±4,7#	32,4±4,4#	0,38±0,08
И4	78,3±6,2*	(2,0 ±0,05)	43,0±3,5#	42,6±1,7#	41,6±3,8*#	0,49±0,01*
И6	126±3,4*	(1,9 ±0,08*)	73,4±2,6*#	64,0±2,4*#	67,3±4,1*	0,64±0,04*
<b>III группа - «диабет»</b>						
Д2	92,3±5,8	(1,8 ±0,1*)	84,8±5,4*	88,4±6,5*	83,4±6,2*	0,46±0,12*
Д4	135±1,9*	(1,9 ±0,26*)	140±3,8*	129±2,9*	118±6,7*#	0,51±0,13*
Д6	156±5,4	(1,8±0,05)	149±5,9*	153±7,2*	118±9,4*#	0,55±0,11*
<b>IV группа – «инфаркт+диабет»</b>						
И2Д2	65,4±1,5*	(2,0 ±0,05*)	27,9±1,7*#	32,1±1,5*#	45,1±3,4*#	0,31±0,15
И2Д4	138±3,4*	(2,0 ±0,14*)	75,3±2,6*#	85,7±4,3*#	70,5±6,0*#	0,47±0,11*
И2Д6	158±14,1*	(2,0 ±0,1*)	98,5±4,1*#	103±6,2*#	98,7±7,8*#	0,49±0,1*
И4Д2	78,6±5,2*	(2,2 ±0,04*)	48,9±4,4#	53,4±9,1#	53,8±3,5#	0,43±0,16*
И4Д4	91,0±3,4*	(2,5 ±0,1*)	60,7±8,7*#	65,7±9,3*#	56,6±5,4#	0,54±0,20*
И4Д6	110±4,1*	(2,0 ±0,03*)	101±7,9*	105±12,2*	59,3±5,7#	0,55±0,06*
И6Д2	87,3±4,4*	(1,9 ±0,09*)	72,4±2,9*	80,3±3,4*	65,3±4,4#	0,32±0,06
И6Д4	135±9,4*	(1,9 ±0,12*)	125±7,6*	121±6,7*	71,4±5,2#	0,43±0,18
И6Д6	167±8,2*	(1,9 ±0,14*)	129±9,8*	132±7,8*	117,5±7,2#	0,52±0,06*
<b>V группа – «диабет+инфаркт»</b>						
Д2И2	79,9±1,7*	(1,7 ±0,06*)	62,2±5,4*#	62,6±9,1*#	60,3±3,4*#	0,35±0,07
Д2И4	117±7,7*	(1,7 ±0,06*)	68,0±8,4*#	69,3±7,1*#	67,7±6,2*#	0,47±0,07*

Примечание. [СЖК]<sub>сыв</sub> – концентрация свободных жирных кислот в сыворотке крови крыс; \* - различия в столбце статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с соответствующим показателем в I группе; # - различия по дыханию митохондрий в каждой группе статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с показателем «свободное окисление» в этой группе.

Несоответствие высокой скорости потребления кислорода при окислении субстрата и показателей дыхательного контроля может быть связано с разобщением процессов окисления и фосфорилирования вследствие протонофорного действия насыщенных и ненасыщенных свободных жирных кислот (Schönfeld P., 1990; Мохова Е.Н., Хайлова Л.С., 2005; Di Paola M., Lorusso M., 2006). Действительно, добавление в среду инкубации как пальмитиновой, так

и арахидоновой кислот приводит к увеличению скорости потребления кислорода митохондриями сердца интактных крыс (табл. 3). Полученные результаты, свидетельствующие об усилении дыхания митохондрии интактных животных в присутствии свободных жирных кислот, хорошо согласуются с литературными данными. Однако, в ходе предварительных исследований по изучению влияния жирных кислот на дыхание митохондрий, выделенных из сердец животных с моделируемыми патологиями, была обнаружена реакция, противоположная ожидаемой: при внесении в среду инкубации арахидоновой или пальмитиновой кислоты происходило резкое подавление дыхания митохондрий, вплоть до полной его остановки при дальнейшем увеличении концентрации жирных кислот. Такой эффект может быть обусловлен тем, что митохондрии сердца модельных животных уже находятся в разобщенном состоянии. Имеются единичные сведения, что свободные жирные кислоты могут оказывать ингибирующее действие на разобщенное дыхание митохондрий сердца, но в определенных условиях и в присутствии протонофоров (Di Paola M., Lorusso M., 2006).

Степень снижения скорости потребления кислорода при добавлении жирных кислот в используемых концентрациях не во всех экспериментальных группах выражена одинаково (табл. 3). Значительное подавление дыхания митохондрий наблюдалось в II группе, тогда как в III группе ингибирующее влияние жирных кислот было статистически не значимо. В IV и V экспериментальных группах ингибирование дыхания митохондрий при добавлении жирных кислот было наиболее выражено на относительно ранних сроках после комбинированного воздействия (табл. 3).

Таким образом, на основании полученных результатов по влиянию свободных жирных кислот на дыхание митохондрий, нельзя однозначно утверждать, что наблюдаемое увеличение скорости потребления кислорода обусловлено только протонофорным действием жирных кислот: возможны какие-то иные процессы с их участием. В частности, это может являться следствием накопления метаболитов жирных кислот и ингибирования ими мембраносвязанных и внутримитохондриальных ферментов (Ventura-Clapier R., Garnier A., Veksler V., 2003; Lopaschuk G.D., и др., 2010).

Так, например, вполне вероятно, что свободные жирные кислоты являются модуляторами активности эндогенных фосфолипаз, что обеспечивает поддержание мембранных структур кардиомиоцитов при адаптации миокарда к патологическому воздействию. Одним из источников свободных жирных кислот в клетке может быть повышенная активность внутриклеточных фосфолипаз: ключевым моментом в высвобождении жирных кислот является отклонение в процессе мембранного ремоделирования, приводящие к дисбалансу между

деацилированием и реацилированием (Grynberg A., 1999). Показано, что на начальной стадии ишемии процесс аккумуляции свободных жирных кислот протекает медленно, причем жирные кислоты отщепляются исключительно от мембранных фосфолипидов (Van der Vusse G.J. et al., 1997). На более поздних стадиях ишемии возрастает концентрация лизофосфолипидов и накопление токсичных продуктов распада жирных кислот (Van der Vusse G.J. et al., 1997), что создает условия для дополнительного повышения потребности миокарда в кислороде, не связанного с увеличением его механической работы.

Для проверки этого предположения, в настоящем исследовании был использован метод ингибиторного анализа, с применением бромфенацилбромида (БФБ), ингибитора фосфолипазы  $A_2$  (Chang J.J., Musser H., McGregor H., 1987). При добавлении в среду инкубации митохондрий сердца интактных животных БФБ не оказывал влияния на дыхание митохондрий этой группы. Однако у модельных животных добавление БФБ приводило к подавлению дыхания митохондрий практически во всех группах (табл. 4). Сравнительный анализ изменения интенсивности свободного окисления в ответ на добавление свободных жирных кислот и БФБ при рассматриваемых патологиях показывает, что в большинстве случаев снижение дыхания митохондрий при ингибировании фосфолипазы  $A_2$  сопоставимо с таковым в присутствии жирных кислот (табл. 4).

По-видимому данное ингибирование активности фосфолипазы  $A_2$  жирными кислотами и/или продуктами их метаболизма (Брагина Н.А. и др., 1999) осуществляется по известному механизму субстратного торможения, когда избыток субстрата приводит к утрате чувствительности воспринимающих его структур. Снижение активности фосфолипазы  $A_2$  может быть также обусловлено ионофорным действием свободных жирных кислот (Sharpe M.A., Cooper C.E., Wrigglesworth J.M. 1994) и накоплением внутримитохондриального кальция. При ишемии миокарда кальций по-разному влияет на фосфолипазу  $A_2$ : начальное увеличение  $Ca^{2+}$  стимулирует ее, а высокая концентрация этого иона – ингибирует (Grynberg A., 1999). Известно несколько возможных путей регуляции активности внутриклеточных фосфолипаз  $A_2$ , но при этом общий механизм регуляции сложен и до конца не изучен (Брагина Н.А., и др., 1999).

Выраженная реакция митохондрий на БФБ может быть свидетельством сохраненной лабильности митохондриальной фосфолипазы  $A_2$  и, косвенным образом, большей устойчивости мембран митохондрий к повреждению на ранних стадиях развития патологического процесса, когда происходит активное включение и использование компенсаторных механизмов. В то же время отсутствие такой реакции на поздних стадиях патологического процесса следует рассматривать как подтверждение его необратимости.

Нужно отметить, что, судя по изменению всех рассмотренных к этому моменту показателей (дыхания митохондрий, структурных изменений миокарда, морфометрических параметров, выживаемости при сочетанных патологиях) именно сочетание «инфаркт+диабет» увеличивает устойчивость животных к патологическим воздействиям, и это, по-видимому, является классическим примером проявления перекрестной адаптации. Более слабое проявление кросс-адаптации при сочетании «диабет+инфаркт» обусловлено, скорее всего, относительно медленным нарастанием метаболических изменений в кардиомиоцитах при развитии диабета, а мультиорганный поражение организма при этой патологии приводит к раннему нарушению адаптивных процессов при присоединении инфаркта.

Полученные данные о том, что при рассматриваемых условиях в группах комбинированного воздействия наблюдается сдерживание развития нарушений на уровне метаболизма митохондрий, согласуются с некоторыми литературными данными, свидетельствующими о высокой ишемической резистентности миокарда животных с экспериментально вызванным диабетом (Дубилей Т.А. и др., 2007; Афанасьев С.А. и др., 2009; Nawata T., Takahashi N., Opie T., 2002; Chen H., Shen W.L., Wang X.H., 2006).

Таким образом, на основании собственных и литературных данных, можно уверенно утверждать, что процессы адаптации при развитии ишемического повреждения миокарда тесно связаны с регуляторным влиянием свободных жирных кислот на метаболизм кардиомиоцитов. Наибольшая устойчивость по всем рассматриваемым параметрам наблюдалась в подгруппе животных И4Д2-6, то есть в условиях уже имеющегося ремоделирования миокарда. В тех случаях, когда после коронарооклюзии прошло 6 недель (животные подгруппы - И6Д2-6) сочетание с диабетом уже не усиливало компенсаторных реакций. На ранних сроках постинфарктных изменений (И2Д2-6) компенсаторные процессы, по-видимому, не успевают развернуться в полную силу. Соответственно, реакция миокарда обусловлена разными стадиями адаптации кардиомиоцитов к патологическому воздействию. Исходя из этого, мы предполагаем, что отличие влияния жирных кислот на дыхание митохондрий животных в экспериментальных группах в сравнении с контрольной группой обусловлено именно этим.

Накопление жирных кислот в рассматриваемых условиях, по всей видимости, сдерживает активность фосфолипазы  $A_2$ , что препятствует критическому изменению состава мембран, подвижности мембранных структур и способствует сохранению метаболизма кардиомиоцитов при развитии ишемического повреждения миокарда. Однако нельзя быть уверенным, что процессы, наблюдаемые в изолированных митохондриях, являются точным

отражением процессов, происходящих в целой клетке. С этой точки зрения представляется необходимым сравнить влияние модуляторов активности фосфолипазы  $A_2$  на скорость поглощения кислорода кардиомиоцитами экспериментальных животных при наличии и в отсутствие в среде инкубации свободных жирных кислот.

### Влияние свободных жирных кислот на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами

Результаты проведенного исследования дыхания кардиомиоцитов в присутствии жирных кислот и модуляторов фосфолипазы  $A_2$  представлены в таблице 4.

Таблица 4

Влияние жирных кислот и модуляторов активности фосфолипазы  $A_2$  на скорость поглощения кислорода изолированными кардиомиоцитами ( $M \pm SD$ )

Подгруппы	Скорость поглощения кислорода, нмоль в мин на мг белка				
	Без добавок (СПК <sub>исх</sub> )	Добавки			
		Арахидо- новая к-та	Пальмити- новая к-та	Мелитин	Бромфена- цилбромид
<b>I группа – контроль</b>					
-	55,4±3,0	78,5 ±2,1#	71,1±1,9#	75,5±0,6#	49,9 ±4,0
<b>II группа – «инфаркт»</b>					
И6	122,3±8,5*	81,3 ±6,5#	86,5±5,8#	110,9±9,3*	42,8±4,4#
<b>III группа – «диабет»</b>					
Д6	144,3±12,4*	77,8±4,0#	83,8±9,2#	157±10,8*	50,3±3,7#
<b>IV группа – «инфаркт+диабет»</b>					
И4Д2	178,8±19,4*	50,2 ±3,5*#	63,5±1,8#	153,8±5,7*	45,0±2,3#
И4Д6	189,3±4,2*	186,6±8,8*	185,1±18,8*	212,6±54,4*#	126,3±13,0*#
<b>V группа – «диабет+инфаркт»</b>					
Д2И4	145,8±10,8*	245,5±14,7*	146,3±11,4*	214,0±27,7*#	136,5±14,7*

*Примечание.* \* - различия в столбце статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с соответствующим показателем в I группе; # - различия в каждой группе статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с показателем СПК<sub>исх</sub> в этой группе.

Кардиомиоциты интактных животных отвечали на введение жирных кислот аналогично митохондриям, то есть увеличением скорости потребления кислорода. Стимулирование фосфолипазы  $A_2$  внесением в среду инкубации клеток её активатора, мелитина (Shier W.T., 1979), приводило к усилению дыхания кардиомиоцитов, сопоставимому с действием жирных кислот (табл. 4). В группах с монопатологиями, II и III, напротив, мелитин не оказывал стимулирующего действия на дыхание кардиомиоцитов, однако наблюдалось

снижение скорости поглощения кислорода после введения в среду инкубации БФБ арахидоновой или пальмитиновой кислот на фоне исходно высокого потребления кислорода (табл. 4). Эти данные подтверждают высказанное выше предположение о взаимосвязи изменений в интенсивности поглощения кислорода и активности фосфолипазы  $A_2$ , обусловленных жирными кислотами, в кардиомиоцитах при моделируемых воздействиях.

Однако в группах комбинированного воздействия результаты оказались не столь однозначными. Во-первых, обнаружено резкое отличие по влиянию пальмитиновой и арахидоновой кислот на дыхание кардиомиоцитов в V группе: добавление арахидоновой кислоты приводило к увеличению скорости поглощения кислорода клетками, тогда как добавление пальмитиновой не оказывало ни тормозного, ни стимулирующего действия (табл. 4). При этом добавление мелитина оказывало значительное стимулирующее влияние, а БФБ не изменял дыхания кардиомиоцитов (табл. 4). Эти наблюдения не позволяют однозначно утверждать, что в данном случае увеличение потребления кислорода обусловлено именно модуляцией активности фосфолипазы  $A_2$ . Во-вторых, в IV группе также обнаружена разная реакция на жирные кислоты и модуляторы фосфолипазы  $A_2$  в двух исследуемых подгруппах: в подгруппе И4Д2 обе жирные кислоты и БФБ оказывали ингибирующее влияние на скорость потребления кислорода кардиомиоцитами, при этом мелитин не стимулировал дыхание клеток (табл. 4). В подгруппе И4Д6, напротив, ни пальмитиновая, ни арахидоновая кислоты не влияли на скорость потребления кислорода клетками, тогда как мелитин оказывал небольшое стимулирующее, а БФБ – ингибирующее действие на дыхание кардиомиоцитов.

Разнообразие ответных реакций кардиомиоцитов на разные жирные кислоты, стимуляцию или ингибирование фосфолипазы  $A_2$  при прямом, опосредованном или комбинированном воздействиях, в динамике развития адаптивных процессов в миокарде, свидетельствуют о том, что изменение активности эндогенных фосфолипаз – не единственная мишень неэтерифицированных жирных кислот как модуляторов метаболизма клеток, что направляет на поиск других механизмов регуляции метаболизма кардиомиоцитов.

### **Механизмы разобщающего действия жирных кислот как адаптивная защита сердца**

В зависимости от концентрации жирные кислоты могут оказывать различное действие. В низких концентрациях свободные жирные кислоты, в том числе арахидоновая и пальмитиновая, оказывают ресопрягающее действие, восстанавливая перенос протонов в дыхательной цепи митохондрий и окисление

НАД-зависимых субстратов; в микромолярных концентрациях - вызывают «мягкое разобщение» и ингибируют процесс образования АФК, не приводя при этом к изменению проницаемости внутренней мембраны митохондрий сердца (Di Paola M., Lorusso M., 2006; Schönfeld P., Wojtczak L., 2007). С этой точки зрения представляется важной задачей оценить вклад различных механизмов разобщения окисления и фосфорилирования с участием свободных жирных кислот в митохондриях сердца при развитии ишемического и диабетического повреждения миокарда, с позиции их защитного действия.

Показанное выше (табл. 3) разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях может быть обусловлено протонофорным действием свободных жирных кислот, в частности, при участии белков-переносчиков внутренней мембраны митохондрий: АДФ/АТФ- и аспартат/ глутаматного антипортеров. В этом случае ингибитор АДФ/АТФ-антипортера, карбоксиатрактитат (кАтр), и субстраты переносчиков - АДФ, аспартат и глутамат - способны подавлять разобщающее действие жирных кислот (Мохова Е.Н., Хайлова Л.С., 2005; Самарцев В.Н., Кожина О.В., 2007; Самарцев В.Н., Кожина О.В., 2008). В нашем исследовании АДФ в присутствии олигомицина, ингибитора протонного канала АТФазы (Joshi S., Huang Y.G., 1991), и кАтр снижали скорость потребления кислорода митохондриями в экспериментальных группах (табл. 5). Однако нужно отметить, что в III и, на отдаленных сроках развития, IV группах реакция на кАтр слабо выражена или отсутствует, а ингибирующее влияние АДФ уменьшается по мере увеличения суммарной длительности патологий (табл. 5). Эти результаты можно объяснить тем, что АДФ/АТФ- и аспартат/глутаматный антипортеры могут функционировать совместно как разобщающий комплекс с общим пулом жирных кислот (Самарцев В.Н., Кожина О.В., Полищук Л.С., 2006; Кожина О.В., 2007). Возможно, что и в наших условиях жирные кислоты под влиянием кАтр перемещаются к аспартат/глутаматному антипортеру, благодаря чему компенсируется выключение из разобщения АДФ/АТФ-антипортера. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, что в присутствии глутамата снижается разобщающее действие свободных жирных кислот (Кожина О.В., Каратецкова М.П., Самарцев В.Н., 2006).

При обсуждении в литературе физиологического значения процессов разобщения в митохондриях было высказано предположение, что протонофорная разобщающая активность свободных жирных кислот зависит от интенсивности формирования АФК, и это разобщение направлено на снижение образования АФК (Korshunov S.S. et al., 1998; Мохова Е.Н., Хайлова Л.С., 2005; Кожина О.В., 2007; Halestrap A.P., Pasdois P., 2009). В присутствии антиоксидантов разобщающая активность пальмитата приблизительно на 80% подавляется АДФ и аспартатом, а в отсутствие антиоксидантов накопление АФК приводит к

изменению свойств АДФ/АТФ-антипортера (Самарцев В.Н., Кожина О.В., Полищук Л.С., 2006; Кожина О.В. 2007). Соответственно, сохраненная реакция на АДФ свидетельствует об активности антиоксидантных систем в митохондриях (Самарцев В.Н., Кожина О.В., Полищук Л.С., 2006; Кожина О.В. 2007; Самарцев В.Н., Кожина О.В., 2008).

Таблица 5

Влияние различных метаболических супрессоров на скорость поглощения кислорода митохондриями сердца экспериментальных крыс ( $M \pm m$ )

Подгруппы	Скорость поглощения кислорода, нмоль в мин на мг белка			
	Свободное окисление	Добавки		
		карбоксиатрактилат	олигомицин+АДФ	циклоспорин А
<b>I группа – контроль</b>				
-	26,5±1,9	28,8±4,5	26,3±2,5	24,0±2,0
<b>II группа «инфаркт»</b>				
И2	76,0±1,9*	31,4±1,9#	44,2±4,2#	34,1±1,7#
И4	78,3±6,2*	52,5±2,9#	56,3±2,5#	39,0±2,0#
И6	126±3,4*	75,9 ±3,5#	72,5±6,3#	91,4±4,1#
<b>III группа - «диабет»</b>				
Д2	92,3±5,8*	89,8±3,9	33,3±3,2#	63,5±5,3#
Д4	135±3,9*	129 ±6,2	71,6±3,5#	103±9,8#
Д6	156±5,4*	129±8,3	91,1±2,7#	106±9,1#
<b>IV группа - «инфаркт+диабет»</b>				
И2Д2	65,4±2,5*	31,6±3,3 #	36,6±2,6#	35,6±1,6#
И2Д4	138±3,4*	83,6±3,9#	80,3±5,7#	99,2±6,4#
И2Д6	158±14,1*	135±11,9	122±9,8#	116±12,0#
И4Д2	78,6±5,2*	69,8 ±4,4	54,1±3,7#	68,8 ±5,2
И4Д4	91,0±3,4*	89,2 ±3,7	58,9±2,1#	86,3±3,9
И4Д6	110±4,1*	86,9±9,9	88,9±5,4#	114 ±2,8
И6Д2	87,3±4,4*	72,1±5,2	54,4±3,2#	61,2±4,6#
И6Д4	135±9,4*	139,4±4,3	62,4±3,2#	87,1±3,8#
И6Д6	167±8,2*	143±7,2	129±6,2#	123±6,4#
<b>V группа - «диабет+инфаркт»</b>				
Д2И2	79,9±1,7*	56,9±6,2#	56,2±5,2#	73,2±3,6
Д2И4	117±7,7*	72,1±7,5#	77,5±6,8#	93,6±4,7

Примечание. \* - различия в столбце «свободное окисление» статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с показателем в I группе; # - различия в группе статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с показателем «свободное окисление» в этой же группе.

Таким образом, наблюдаемое нами уменьшение реакции на АДФ по мере развития рассматриваемых патологий (табл. 5) может быть следствием истощения возможностей антиоксидантных систем. Известно, что при хронической ишемии в кардиомиоцитах нарушается баланс между перекисным окислением липидов и

эндогенными жирорастворимыми антиоксидантами (Лебедев А.В., Афанасьев С.А., Алексеева Е.Д., 1995).

В рамках гипотезы о защитной функции разобщения предполагается, что если системы утечки протонов с участием СЖК по рассмотренному выше механизму с участием АДФ/АТФ- и аспартат/глутамат- антипортеров оказывается недостаточно, включается более радикальный путь, ведущий к той же цели (Skulachev V.P., 1997). Подобным механизмом может быть формирование МРТР, пор внутренней мембраны митохондрий, образующихся в определенных специфических условиях, при накоплении свободных жирных кислот и перегрузке митохондрий ионами кальция (Novgorodov S.A., Gudz T.I., 1996; Skulachev V.P., 1997; Halestrap A.P., Pasdois P., 2009).

В нашем исследовании ингибирование МРТР циклоспорином А приводило к подавлению дыхания при обеих монопатологиях (II и III группы) (табл. 5). В группах комбинированного воздействия ингибирующее действие циклоспорино А проявлялось не во всех группах, а именно, отсутствовало в подгруппах И4Д2-Д6 (IV группа) и Д2И2-4 (V группа) (табл. 5). Нужно отметить, что подгруппе И4Д2-6 не обнаружено реакции не только на циклоспорин А, но и на кАтр, при этом нарастание свободного дыхания было наиболее медленным в сравнении с остальными экспериментальными группами (табл. 5). Возможно, это объясняется некоторой стабилизацией показателей на этих сроках комбинированного воздействия. С другой стороны, отсутствие реакции на используемые нами ингибиторы может быть объяснено включением в данных группах других механизмов разобщения. Так, например, жирные кислоты способны формировать циклоспорин А-нечувствительные поры (Белослудцев К.Н., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д., 2005, 2008). Разобщающее действие жирных кислот может осуществляться с участием UCP-белков (Skulachev V.P., 1997; Murphy M.P. et al. 2003; Halestrap A.P., Pasdois P., 2009; Lopaschuk G.D. et al., 2010). Подавление дыхания при рассматриваемых состояниях, как уже показано выше, может быть обусловлено ингибированием митохондриальной фосфолипазы А<sub>2</sub>. Не исключено, что разнообразие ответных реакций обусловлено одновременным включением разных механизмов разобщения с участием жирных кислот подобно тому, как это происходит в митохондриях при стабилизации параметров метаболизма в процессе выхода животных из гипометаболического состояния (Amerkhanov Z.G. et al., 1996).

Таким образом, по совокупности литературных и полученных нами данных можно предположить, что разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях сердца при моделируемых состояниях выполняет защитную функцию и направлено на предотвращение накопления АФК. Это разобщение носит неспецифический характер и реализуется с одновременным включением

как минимум двух механизмов - с участием АДФ/АТФ-антипортера и циклоспорин-чувствительной поры, МРТР.

### **Оценка эффективности аэробного и анаэробного процессов энергообразования по активности ферментов в кардиомиоцитах\***

При кислородном дефиците для миокарда предпочтительнее окисление глюкозы, как более «кислород-эффективного» процесса. Однако при диабете, в первую очередь в связи с нарушением инсулин-чувствительного транспорта глюкозы, основным утилизируемым субстратом являются жирные кислоты. К тому же, массивное проникновение жирных кислот в митохондрии вызывает избыточное накопление в них ацетил-КоА, что влечёт за собой угнетения активности пируватдегидрогеназного комплекса (Александров А.А., 2003; Lopashuk G.D., 2010). Кроме того, включение ацетил-КоА в цикл лимонной кислоты приводит к сопутствующему накоплению цитрата и ингибированию фосфофруктокиназы, что, в конечном счете, снижает количество пирувата, и основным энергетическим источником в этих условиях становятся жирные кислоты.

На начальном этапе изменения в дыхательной цепи митохондрий сопровождаются (после кратковременного усиления) резким снижением активности НАД-зависимого пути окисления (Лукьянова Л.Д., 2000, 2001). Это приводит к активизации компенсаторных альтернативных метаболических потоков, в частности, сукцинатоксидазного пути окисления. Феномен быстрого окисления янтарной кислоты сукцинатдегидрогеназой с быстрым ресинтезом АТФ получил название «монополизации дыхательной цепи» (Кондрашова М.Н., 1991). В механизме декомпенсации сердечной патологии важнейшую роль играет снижение активности быстрого метаболического кластера митохондрий. В большинстве случаев за этим стоит ингибирование активного центра сукцинатдегидрогеназы.

Существует гипотеза, что при адаптации к возрастающим нагрузкам происходит перестройка митохондриальной системы энергообеспечения в сердце (Ким Н.П., 1987), при которой наработка радикалов  $O_2$ , которая на 70% происходит в митохондриях, минимальна, а энергетический выход в виде ресинтеза АТФ – максимален, подтвержденная экспериментальными данными (Розенфельд А.С., Маевский Е.И., 2004).

---

\* Этот раздел выполнен совместно с Д.С. Кондратьевой, научным сотрудником лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН, г. Томск

Такая ситуация возможна, если при фосфорилирующем дыхании митохондрий используется флавинозависимый субстрат сукцинат (Кондрашова М.Н., 1991; Schild L. et al., 1997; Медведев Ю.В., Толстой А.Д., 2000).

Как уже было показано выше, при обеих моделируемых патологиях наблюдается увеличение уровня свободных жирных кислот в сыворотке крови, повышение скорости потребления кислорода и разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца экспериментальных животных. Все эти показатели на хронической стадии эксперимента значительно отличались от контрольных. Поэтому представляется интересным исследование энергетического обмена в кардиомиоцитах в условиях, когда резервные возможности срочной адаптации, по-видимому, уже исчерпаны. В связи с вышесказанным, является важным определение энергетического субстрата и оценка эффективности двух основных энергопоставляющих процессов при развитии адаптивных процессов при моделируемых состояниях.

Многочисленными исследователями предполагается, что на уровне энергообразования основным звеном патогенеза при исследуемых патологиях является массивный вход жирных кислот в кардиомиоциты, с соответствующими неблагоприятными последствиями для клетки (Brindley D.N. et al., 2010; Lopaschuk G.D. et al., 2010, обзоры). Проведенное в настоящей работе исследование не показало статистически значимых различий по уровню свободных жирных кислот в сыворотке крови между группами отдельных и комбинированного воздействий, хотя в сравнении с контрольной сывороткой этот показатель был выше (табл. 3). Этот результат хорошо согласуется с литературными данными. Однако при исследовании содержания свободных жирных кислот в гомогенате миокарда не было обнаружено различий между контрольной и экспериментальными группами (табл. 6).

Таблица 6

Содержание свободных жирных кислот и активность лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы в миокарде крыс ( $M \pm m$ )

Группы	[СЖК], нмоль/мг белка		Активность ферментов, о.ед.		
	гомогенат	митохондрии	ЛДГ	СДГ	ЩФ
контроль	1,02±0,14	0,83±0,12	0,73±0,04	0,51±0,02	0,46±0,01*
«инфаркт» (И6)	1,19±0,14	2,86±1,15*#	0,41±0,01*	0,32±0,01*#	0,24±0,02*#
«диабет» (Д6)	1,51±0,17	5,83±1,31*^	0,37±0,03*	0,20±0,02*^	0,50±0,02^
«инфаркт+диабет» (И4Д2)	1,35±0,15	1,88±0,78*#^	0,62±0,03#^	0,78±0,05*#^	0,47±0,03

Примечание. \* -  $p < 0,01$  по отношению к контролю; # -  $p < 0,01$  в сравнении с группой «диабет»; ^ -  $p < 0,01$  в сравнении с группой «инфаркт».

Другими словами, этот результат свидетельствует о том, что контролирующий механизм поступления свободных жирных кислот в кардиомиоциты продолжает успешно функционировать и при хронических состояниях. С этой точки зрения более важным представляется дальнейшая судьба жирных кислот в клетке.

Интересный результат показало исследование содержания свободных жирных кислот непосредственно в суспензии митохондрий: наблюдалось выраженное отличие по их содержанию в митохондриях всех исследованных групп (табл. 6). Наиболее высокое содержание жирных кислот было в группе «диабет»: их уровень более чем в 5 раз превышал контрольную величину. В митохондриях сердца животных группы «инфаркт» обнаружено трехкратное увеличение содержания жирных кислот. Однако в группе комбинированного воздействия этот показатель был наиболее близким к контрольному (табл. 6). Возможно, такие результаты обусловлены разными механизмами утилизации жирных кислот при различных патологиях.

Окисление жирных кислот является кислородзатратным процессом, что повышает значимость анаэробного пути энергообразования. По результатам гистоэнзимологического исследования активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) кардиомиоцитов при монопатологиях достоверно ниже, чем у контрольных животных (табл. 6), что может свидетельствовать о снижении процесса анаэробного энергообразования. При комбинированном воздействии активность ЛДГ не имела статистически значимых различий с данным параметром в контроле, что предполагает нормальное протекание процессов гликолиза в данной группе.

При анализе результатов исследования активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) обнаружено снижение этого показателя в 1,5 раза в группе «инфаркт», тогда как в группе «диабет» наблюдалось снижение активности этого фермента в 2,6 раза, в сравнении с группой «контроль» (табл. 6). Однако в группе комбинированного воздействия напротив, активность СДГ в 2,5 – 3,5 раза выше не только в сравнении с монопатологиями, но и статистически значимо превышает контрольный показатель.

Из полученных данных следует, что в миокарде при развитии патологических состояний в отдельности снижается эффективность как аэробного, так и анаэробного пути энергообразования. Однако при формировании комбинированных патологий уровень анаэробных процессов сохраняется, а активность аэробного пути образования АТФ даже повышается. С одной стороны, такие результаты могут быть следствием компенсаторно-адаптационной перестройки процессов энергопродукции в митохондриях сердца с переключением на сукцинатоксидазный путь окисления. С другой стороны,

усиление аэробных процессов может быть так же связано с активацией ангиогенеза в рассматриваемых условиях, и, соответственно, с увеличением кровоснабжения миокарда и улучшением транспортной функции сосудов микроциркуляторного русла.

Для оценки состояния капиллярного звена микроциркуляторного русла часто используют такие показатели, как плотность распределения капилляров и, в качестве маркера транспортной функции эндотелия, активность щелочной фосфатазы (ЩФ) (Дзюман А.Н., 2002; Грибань П.А., Мартыненко Е.Е., Лемешко Т.Н., 2010; Квитницкая-Рыжова Т.Ю. и др., 2011). Активность ЩФ связана с трансапиллярным обменом веществ, транспортом ионов и преобразованием энергии и может отражать интенсивность обменных процессов в патологическом миокарде (Квитницкая-Рыжова Т.Ю. и др., 2011). Действительно, как уже показано выше, при развитии моделируемых состояний наблюдается увеличение плотности капилляров в расчете на  $1 \text{ см}^2$  миокарда. Количество капилляров в миокарде ЛЖ во всех группах (на рассматриваемом сроке патологий длительностью 6 недель) в два и более раза превышало этот показатель в контрольной группе (табл. 2). Однако исследование активности ЩФ показало различие в состоятельности транспортной функции эндотелия капилляров при прямом, опосредованном и комбинированном воздействиях (табл. 6). Так во II группе наблюдалась низкая активность ЩФ, в то время как в III и IV группах не обнаружено отличий в величине этого показателя в сравнении с контрольным, хотя наиболее значимое увеличение количества капилляров обнаружено именно в группах с диабетом (табл. 2). Тем не менее, полученные данные по увеличению плотности капилляров в патологическом миокарде, казалось бы, позволяют утверждать, что в усилении анаэробного звена энергопродукции при комбинированном воздействии важным звеном является улучшение кислородного обеспечения вследствие активации ангиогенеза. Однако сопоставление данных по активности СДГ и ЩФ показало отсутствие связи между этими двумя показателями и плотностью капилляров (табл. 6). Соответственно, нельзя однозначно утверждать, что изменения в интенсивности аэробных процессов энергообразования в кардиомиоцитах обусловлены только улучшением кровоснабжения миокарда, хотя это, несомненно, вносит значительный вклад в поддержании функциональной активности сердца.

Таким образом, полученные данные подтверждают предположение, что при моделируемых состояниях в группах комбинированного воздействия кардиомиоциты имеют менее выраженное нарушение энергетического метаболизма и это, в какой-то степени, связано с адаптивной активацией СДГ. Предполагается, что именно изменение активности СДГ обеспечивает адаптацию

и поддержание энергетики клетки в условиях стресса (Кондрашова М.Н., 1991; Лукьянова Л.Д., 2001, 2011).

### **Сравнительный анализ изменений показателей стресс-реакции в организме животных из разных экспериментальных групп**

Поскольку локальное нарушение кровоснабжения и инфаркт миокарда являются прямым вмешательством в работу сердца, это позволяет предположить активацию специфических для данного органа защитных реакций. Диабет вызывает не прямое воздействие на миокард, и поэтому нарушение метаболизма в данном случае является следствием изменений последнего на уровне всего организма. Соответственно, разная устойчивость миокарда к прямому, опосредованному и комбинированному воздействиям может быть обусловлена особенностями проявлениями неспецифической стресс-реакции.

Миоглобин обнаруживается в плазме крови при поражениях (травма, ишемия) любого типа мышц и, в частности, является клиническим маркером некроза сердечной мышцы, ассоциированным с инфарктом миокарда. При моделируемых состояниях на всех стадиях их развития обнаружено увеличение уровня сывороточного миоглобина (табл. 7). Наиболее выраженные изменения наблюдаются в группе II «инфаркт». В III группе «диабет» увеличение миоглобина несколько меньше на ранних стадиях, что обусловлено, по-видимому, опосредованным и, соответственно, требующим временных затрат, повреждением сердечной мышцы. Таким образом, моделирование обеих патологий само по себе является сильным стрессором, приводящим к соответствующим функционально-метаболическим изменениям в организме крыс.

Стресс-реакция является не только предшественником адаптивного ответа, но и играет важную роль в его формировании (Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., 1988; Никонов В.В., 2002). В классическом понимании общего адаптационного синдрома стадия истинной резистентности характеризуется комплексом изменений в нейроэндокринной системе (Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А., 1979; Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., 1988). В качестве классических маркеров стресса, широко используемых в экспериментальных исследованиях, используют изменение уровня АКТГ и кортизола в плазме крови. К тому же соотношение кортизол/инсулин позволяет дополнительно оценить выраженность стресс-реакции: его повышение отражает увеличение интенсивности катаболических процессов и снижение эффективности системы энергообразования (Пшенникова М.Г. и др., 1996).

При анализе показателей гормонального статуса в экспериментальных группах была выявлена только тенденция повышения уровня АКТГ в IV группе по сравнению с аналогичными показателями в V и I-III группах (табл. 7).

Таблица 7

Показатели стресс-реакции при постинфарктном и диабетическом повреждении миокарда ( $M \pm m$ )

Подгруппы	Концентрация в сыворотке крови				
	Миоглобин, нг/мл	АКТГ, нг/л	Кортизол, нмоль/л	Инсулин, мкед/мл	Кортизол/инсулин
<b>I группа – контроль</b>					
-	27±1,5	85,6±2,4	16,3±0,5	9,3±0,5	1,8±0,1
<b>II группа - «инфаркт»</b>					
И2	97±2,0*	81,9±1,9	28,1±0,6*	8,3±1,9	3,4±0,3*
И4	80±2,5*	76,3±1,1*	29,4±0,9*	8,7±1,9	3,3±0,5*
И6	87±3,6*	74,4±1,1*	29,7±1,9*	8,3±1,4	3,4±0,6*
<b>III группа – «диабет»</b>					
Д2	56±1,8*	73,5±1,0*	33,7±3,6*	1,4±0,05*	24,2±2,5*
Д4	55±1,6*	77,0±1,2*	33,1±1,6*	1,5±0,09*	22,0±1,7*
Д6	94±1,1*	80,0±2,3	30,6±0,9*	1,4±0,16*	21,6±2,3*
<b>IV группа – «инфаркт+диабет»</b>					
И2Д2	57±1,5*	94,4±3,2*	30,6±2,4*	1,9±0,05*	15,0±2,0*
И2Д4	67±0,7*	98,1±2,7*	28,1±1,1*	2,0±0,08*	14,8±3,5*
И2Д6	115±3,9*	103,1±3,7*	32,1±2,2*	2,8±0,26*	11,9±2,6*
И4Д2	73±1,5*	86,1±2,0	45,9±5,0*	4,2±0,24*	10,9±0,5*
И4Д4	81±2,9*	89,4±2,9*	45,6±1,6*	4,2±0,2*	11,0±0,2*
И4Д6	138±2,5*	88,1±1,6*	47,5±1,2*	3,8±0,1*	12,5±0,6*
И6Д2	91±1,8*	80,6±2,0	55,6±2,8*	2,8±0,23*	19,5±1,5*
И6Д4	95±1,5*	86,9±1,0	50,0±2,0*	3,7±0,3*	12,2±0,9*
И6Д6	118±3,1*	80,0±1,0	33,1±1,6*	2,9±0,2*	11,5±1,1*
<b>V группа – «диабет+инфаркт»</b>					
Д2И2	71±2,0*	75,9±4,1*	50,0±0,8*	2,4±0,3*	21,1±1,4*
Д2И4	125±4,8*	79,9±3,2	74,4±2,3*	3,1±0,1*	24,1±3,2*

Примечание. \* - результаты в столбце статистически значимо ( $p < 0,05$ ) отличаются от соответствующего показателя в группе «контроль».

Возможно, что резких различий в содержании АКТГ не обнаружено из-за изменчивости содержания этого гормона в плазме крови в разное время суток и/или синтез АКТГ на рассматриваемых стадиях патологий ингибирован кортизолом по известному механизму отрицательной обратной связи. С этой точки зрения более информативным стало исследование по содержанию

кортизола: уровень кортизола в плазме крови повышался во всех экспериментальных группах в сравнении с группой «контроль» (табл. 7). Этот показатель был практически в 2 раза выше при отдельных и в 3-4 раза – при комбинированных воздействиях (табл. 7). Содержание инсулина в плазме крови было сниженным во всех группах с диабетом относительно контроля, при этом величина этого показателя варьировалась в зависимости от моделируемого воздействия, и наименьшее содержание инсулина ожидаемо наблюдалось в III группе. В группах комбинированного воздействия снижение уровня инсулина было значительно менее выражено – в 2-3 раза ниже контрольного уровня (табл. 7).

Дополнительным параметром выраженности стресс-реакции при моделируемых состояниях явилось сопоставление содержания кортизола и инсулина в плазме крови по отношению друг к другу. Так, несмотря на то, что индекс кортизол/инсулин увеличен относительно контроля во всех экспериментальных группах, выявились значительные отклонения величины этого показателя при отдельных и комбинированных воздействиях (табл. 7). Наиболее высоким индекс кортизол/инсулин оказался в III и V группах, что обусловлено, в первую очередь, патологией поджелудочной железы. Однако в IV группе, при сочетании «инфаркт+диабет» индекс кортизол/инсулин значительно ниже, чем в III группе (табл. 7). При этом важно отметить, что при противоположной комбинации моделируемых состояний, в V группе, индекс кортизол/инсулин был сопоставим с величиной этого показателя в III группе, несмотря на значительное повышение содержания в плазме крови кортизола и инсулина (табл. 7). В совокупности, серьезные отклонения от контрольного уровня в величинах миоглобина, кортизола и индекса кортизол/инсулин свидетельствуют о более тяжелом протекании патологического процесса в V группе.

Относительное снижение уровня АКТГ в II, III и V группах, а также значительное увеличение индекса кортизол/инсулин в III и V группах может быть обусловлено истощением резервных свойств организма животных в указанных группах. Эти признаки являются свидетельством перехода стресс-реакции из стадии резистентности в стадию истощения (Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А., 1979; Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., 1988), то есть в стадию дезинтеграции регуляторных и исполнительных механизмов (Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., 1988; Никонов В.В., 2002; Мазуркевич Г.С. и др., 2004). Возможно, это объясняется генерализованной реакцией организма вследствие мультиорганный поражения при диабете. Дополнительным подтверждением этому предположению являются данные по исследованию морфометрических (масса тела и сердца, степень гипертрофии миокарда) и метаболических (уровень

глюкозы и свободных жирных кислот в плазме крови, скорость поглощения кислорода и разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца) параметров при моделируемых состояниях. Патологические проявления достаточно быстро развиваются на ранних стадиях во II и III группах, но при сочетанных состояниях этот процесс замедлен в 1,5-2 раза. Сравнение же данных в группах комбинированного воздействия приводит к выводу, что предшествование диабета инфаркту вызывает ухудшение всех рассмотренных показателей и повышение смертности животных по сравнению с моделью с противоположным сочетанием моделируемых патологий.

Различия в реакции миокарда на отдельные и сочетанные патологии могут быть обусловлены тем, что в разных исходных условиях одни и те же стресс-факторы могут восприниматься как различные по силе или степени биологической значимости, что определяет разные по эффективности стандартные адаптационные реакции организма (Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А., 1979). Меньшая выраженность проявлений стресс-реакции при комбинированном воздействии относительно монопатологий может быть обусловлена перекрестной адаптацией и включением альтернативных, как специфических, так и неспецифических, механизмов кардиопротекции. Известно, что одновременно с активацией стресс-реализующих систем происходит повышение активности сопряженных с ними стресс-лимитирующих систем, в частности, эндогенной опиоидной системы (Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., 1988; Парин С.Б., 2010), способной существенно влиять на функции организма именно в стадии истощения (Никонов В.В., 2002; Мазуркевич Г.С. и др., 2004) и значительно повышать устойчивость миокарда при различных стрессовых и патологических воздействиях (Сазонова Е.Н. и др., 2012, обзор).

Таким образом, на основании проведенного исследования можно заключить, что при сочетании прямого и опосредованного поражения миокарда наблюдается наименьшая выраженность системной стресс-реакции и проявление эффекта перекрестной адаптации в том случае, когда повторное стрессовое воздействие возникает на стадии резистентности при адаптации к первому.

### **Заключение**

Результаты собственных исследований и литературные данные, в совокупности, показывают важное значение свободных жирных кислот в регуляции метаболизма кардиомиоцитов в процессах как краткосрочной, так и долговременной адаптации, а также «выбраковки» клеток с необратимыми структурно-функциональными нарушениями путем опосредованного жирными кислотами механизма запуска апоптоза. Сам факт увеличения циркулирующих



патологических факторов животных подтверждает закономерность саморегулирования физиологических процессов. В нормальных условиях, при достаточном уровне кислорода, низкой концентрации ионов кальция в митохондриях и интракардиальных жирных кислот, экзогенные свободные жирные кислоты оказывают стимулирующее действие на метаболизм миокарда. При недостатке кислорода и/или нарушении его утилизации жирные кислоты, снижают интенсивность процессов, посредством которых увеличивается неспецифическая проницаемость митохондриальных мембран. Как показало наше исследование, такое действие свободных жирных кислот позволяет отсрочить возникновение необратимых структурных и функциональных повреждений кардиомиоцитов при долговременном влиянии стрессовых и патологических факторов и раздвигает временные границы стадии резистентности.

Известные на сегодняшний день данные, несомненно, являются лишь видимой частью «айсберга» регуляторных возможностей свободных жирных кислот. Однако этого достаточно, чтобы усомниться в устоявшемся негативном представлении о патогенетической функции циркулирующих жирных кислот при длительной гипоксии. Напротив, очевидно, что увеличение уровня свободных жирных кислот в плазме крови является не столько свидетельством необратимости патологического процесса, сколько необходимым фактором мобилизации защитных ресурсов организма, и, одновременно, первым фронтом защиты, сдерживающим, по мере возможности, развитие необратимых последствий в кардиомиоцитах при краткосрочном, длительном или постоянном действии стрессовых факторов.

### **Выводы**

1. При моделировании метаболической ишемии миокарда прямым (коронарооклюзия и вызванный инфаркт миокарда) и опосредованным (стрептозотоцин-индуцированный диабет) воздействиями на сердце крыс развиваются характерные изменения морфометрических и метаболических параметров (гипертрофия сердца и левого желудочка, уменьшение массы тела и гипергликемия), усугубляющиеся в динамике развития моделируемых состояний. В группах комбинированного воздействия наблюдается меньшая выраженность указанных изменений в сравнении с группами отдельного воздействия.

2. В группах прямого и опосредованного воздействий развиваются однотипные дегенеративные изменения в структуре миокарда и ультраструктуре кардиомиоцитов крыс, сопровождающиеся усилением васкуляризации миокарда, но без соответствующего улучшения транспортной функции эндотелия капилляров. В обеих группах комбинированного воздействия изменения в структуре миокарда выражены в меньшей степени, а усиление васкуляризации

миокарда сопровождается улучшением транспортной функции эндотелия капилляров.

3. Процесс формирования адаптивных реакций при моделируемых состояниях сопровождается разной выраженностью стресс-реакции в экспериментальных группах. Наименьшее проявление стресс-реакции наблюдается в группах, где прямое воздействие на сердце является основным стрессовым фактором. При развитии опосредованно вызванной тканевой гипоксии наблюдается наиболее выраженная стресс-реакция.

4. Скорость потребления кислорода кардиомиоцитами увеличивается в динамике развития всех моделируемых состояний и сопровождается параллельным повышением концентрации свободных жирных кислот в сыворотке крови экспериментальных крыс, однако изменения этих показателей в группах комбинированного воздействия происходят в 1,5-2 раза медленнее.

5. Экзогенные свободные жирные кислоты снижают скорость потребления кислорода изолированными митохондриями сердца в группе прямого и обеих группах комбинированного воздействия, но не оказывают выраженного влияния на дыхание митохондрий в группе опосредованного воздействия. Ингибирование фосфолипазы  $A_2$  в изолированных митохондриях оказывает тормозящий эффект на скорость потребления кислорода митохондриями, аналогичный действию экзогенных жирных кислот.

6. Увеличение скорости потребления кислорода митохондриями сердца при свободном окислении не сопровождается соответствующим увеличением интенсивности фосфорилирующего дыхания: величина дыхательного контроля при всех моделируемых состояниях ниже на 30-50% относительно контроля, при этом наименьшее снижение дыхательного контроля наблюдается в группе комбинированного воздействия «инфаркт+диабет».

7. Разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях сердца обусловлено разными механизмами при отдельных моделируемых патологиях и их разном сочетании. В группах «инфаркт» и «диабет+инфаркт» разобщение реализуется через механизм, связанный с циркуляцией жирных кислот с участием АТФ/АДФ-антипортера. В группах «диабет» и «инфаркт+диабет» нарушение сопряжения процессов окисления и фосфорилирования опосредовано индуцированным жирными кислотами формированием неспецифических митохондриальных пор повышенной проницаемости (МРТР). При этом экзогенные свободные жирные кислоты подавляют дыхание митохондрий, действуя подобно ингибиторам АТФ/АДФ-антипортера и МРТР.

8. Проявление эффекта кросс-адаптации и повышенная резистентность миокарда с наибольшей выраженностью наблюдаются у животных в группе комбинированного воздействия в условиях, когда прямое воздействие на сердце

является фактором, запускающим процессы адаптации при сочетании патологий. Противоположное сочетание, «диабет+инфаркт» вызывает гораздо менее выраженный эффект перекрестной адаптации на уровне миокарда, с ранним истощением резервных свойств организма крыс и повышением смертности животных.

9. Увеличение концентрации циркулирующих жирных кислот является необходимым компонентом триггерного механизма процессов адаптации в условиях воздействия различных стрессовых факторов. Свободные жирные кислоты являются физиологическими модуляторами метаболических процессов в кардиомиоцитах, в том числе, при хронической ишемии миокарда, и, по-видимому, исполняют роль сигнальных молекул в активации центральных и периферических механизмов кардиопротекции.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Inhibitors of the ATP/ADP antiporter suppress stimulation of mitochondrial respiration and  $H^+$  permeability by palmitate and anionic detergents / N.N. Brustovetsky, V.I. Dedukhova, **M.V. Egorova**, E.N. Mokhova, V.P. Skulachev // **FEBS Letters** (IF 3,582). – 1990. – V. 272. – P. 187-189.
2. Механизм активации дыхания кардиомиоцитов ненасыщенными жирными кислотами: роль ионов  $Na^+$  / Н.Н. Брустовецкий, **М.В. Егорова**, Е.В. Гришина, Е.И. Маевский, Ю.М. Кокоз, В.П. Зинченко // **Биологические мембраны** (ИФ РИНЦ 0,318). – 1991. – Т. 8. – С. 824-829.
3.  $Na^+$  - зависимый механизм стимуляции дыхания кардиомиоцитов крысы арахидоновой кислотой: роль перекисного окисления липидов и фосфолипазы  $A_2$  / Н.Н. Брустовецкий, **М.В. Егорова**, В.Г. Гогвадзе, Е.В. Гришина, Е.И. Маевский, Ю.М. Кокоз // **Биологические мембраны** (ИФ РИНЦ 0,318). – 1991. – Т. 9. – С. 907-911.
4. Разобщение окислительного фосфорилирования жирными кислотами и детергентами подавляется ингибиторами ADP/ATP – антипортера / Н.Н. Брустовецкий, **М.В. Егорова**, В.И. Дедухова, Е.Н. Мохова, В.П. Скулачев // **Биохимия** (ИФ РИНЦ 1,162). – 1991. – Т. 56. – С. 1024-1028.
5. Thermoregulatory, carboxyatractilate - sensitive uncoupling in heart and skeletal muscle mitochondria correlates with the level of free fatty acids / N.N. Brustovetsky, **M.V. Egorova**, D.Yu. Gnutov, V.G. Gogvadze, E.N. Mokhova, V.P. Skulachev // **FEBS Letters** (IF 3,582). – 1992. – V. 305. – P. 15-17
6. Афанасьев С.А. Структура и энергетический метаболизм миокарда / С.А. Афанасьев, **М.В. Егорова**, И.Л. Телкова // Коронарная и сердечная недостаточность: коллективная **монография**, посвященная 25-летию НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН и 20-летию филиала НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН «Тюменский кардиологический центр» / под ред. Р.С.Карпова. - Томск: STT, 2005. – С.6-18.

7. **Егорова, М. В.** Методические подходы к получению изолированных кардиоцитов / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова** (ИФ РИНЦ 0,569). – 2005. – Т. 91. – № 5 – С. 514-520.
8. **Егорова, М. В.** Простой метод выделения кардиомиоцитов из сердца взрослой крысы / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины** (ИФ РИНЦ 0,558). – 2005. – Т. 140. – № 9. – С. 357-360.
9. **Егорова, М. В.** Особенности методики получения изолированных клеток сердца / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Бюллетень сибирской медицины** (ИФ РИНЦ 0,351). – 2005. – Т. 4. - прил. 1. – С. 183.
10. **Егорова, М. В.** Получение изолированных кардиомиоцитов при сочетанном применении протеолитических ферментов в малых количествах / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2005. – Т.20. - № 2 (прил.). - С. 77.
11. **Егорова, М. В.** Способ получения изолированных кардиомиоцитов из сердца взрослой крысы / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // **Патент РФ на изобретение № 2279145 от 27.06.06.**
12. **Егорова, М. В.** Сопоставление процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях печени и сердца при адаптации к неблагоприятным факторам в естественных условиях и в эксперименте / М.В. Егорова // **Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы в норме и при патологии: материалы научной конференции с международным участием, 2 ноября 2007 г. - Томск: СибГМУ, 2007 - С. 82-86.**
13. **Некоторые патогенетические аспекты ремоделирования кардиомиоцитов при формировании сердечной недостаточности / С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева, Т.Ю. Реброва, М.В. Егорова, А.В. Евтушенко, С.В. Попов // Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2007. – № 3. – С. 42-45.
14. **Егорова, М. В.** Исследование окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца крыс при экспериментальном постинфарктном кардиосклерозе / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Вестник СПбГМА им. И.И. Мечникова.** – 2007. - № 2. - С. 58.
15. **Егорова, М. В.** Разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях сердца крыс при экспериментальном постинфарктном кардиосклерозе / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2007. - № 1. - С. 50-51.
16. **Егорова, М. В.** «Метаболическая ишемия» при экспериментальном постинфарктном кардиосклерозе / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // **Кардиоваскулярная терапия и профилактика** (ИФ РИНЦ 0,704). – 2007. - №6(5) - С. 97.
17. **Егорова, М. В.** Влияние кардиосклероза на потребление кислорода изолированными кардиомиоцитами / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Вестник аритмологии.** – 2007. - № 47. – С. 56.

18. **Егорова, М. В.** Оценка дыхания митохондрий кардиомиоцитов после экспериментального кардиосклероза / М.В. Егорова // Вопросы интегративной физиологии: материалы региональной научно-практической конференции, Красноярск, 22-23 марта 2007 г., вып. 2. - Красноярск: Изд-во «Верес». - С. 136-140.
19. Роль фосфолипаз в развитии различных патологических процессов как компонента неспецифической ответной реакции на стресс / Т.В.Андреева, Е.С. Алексеевская, **М.В. Егорова** // Актуальные проблемы медицины: материалы XI научно-практической конференции 16-17 мая 2008 г. - Абакан: Изд-во ООО «ДиалогСибирь-Абакан», 2008. - С. 8-11.
20. **Егорова, М. В.** Роль фосфолипазы А<sub>2</sub> в активации дыхания изолированных кардиомиоцитов при постинфарктном кардиосклерозе / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины** (ИФ РИНЦ 0,558). – 2008. – Т. 146. – № 12. – С. 631-634.
21. **Егорова, М. В.** Приспособительные реакции организма крыс при сочетании патологий / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии: материалы научной конференции с международным участием, посвященной 120-летию кафедры нормальной физиологии СибГМУ (ТМИ) и кафедры физиологии ТГУ - Томск: СибГМУ, 2009. – С.139-147.
22. К вопросу о возможной метаболической составляющей аритмогенной резистентности миокарда при сочетанном развитии постинфарктного ремоделирования сердечной мышцы / С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева, Т.Ю. Реброва, **М.В. Егорова**, Б.Н. Козлов, С.В. Попов // **Вестник аритмологии.** – 2010. – № 60. – С. 65-69.
23. Сочетание постинфарктного ремоделирования и сахарного диабета усиливает адаптивные реакции организма / **М.В. Егорова**, С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева, Т.Ю. Реброва // XXI съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. Тезисы докладов. – Москва-Калуга: Типография ООО «БЭСТ-принт», 2010. – С. 202.
24. Проявление адаптивно-приспособительных изменений при сочетанном развитии постинфарктного ремоделирования сердца и сахарного диабета / **М.В. Егорова**, С.А. Афанасьев, С.В. Попов, Р.С. Карпов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины** (ИФ РИНЦ 0,558). – 2010. – Т. 150. – № 8. – С. 132-135.
25. **Егорова, М. В.** Дыхание митохондрий постинфарктного сердца крыс при окислении различных субстратов / М.В. Егорова, Д.С. Кондратьева, С.А. Афанасьев // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2010. – Т. 25. – № 4(1). – С. 116-118.
26. **Егорова, М. В.** Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: современные методические приемы / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2011. – Т. 26. – № 1 (1). – С. 22-28.

27. Possible mechanism of increasing resistance of the myocardium during combination of post infarction remodeling and diabetes mellitus / **M.V. Egorova**, S.A. Afanasiev, D.S. Kondratieva, B.N. Kozlov, S.V. Popov // **Natural Science** (IF 0,61). – 2011. – V. 3. – № 4. – P. 295-300.
28. **Егорова, М. В.** Состояние митохондрий и гипертрофия сердца при развитии стрептозотоцин-индуцированного диабета на фоне экспериментального инфаркта / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2011. – Т. 26. – № 3 (1). – С. 119-124.
29. Энергетический метаболизм миокарда крыс с постинфарктным кардиосклерозом и сахарным диабетом I типа / Д.С. Кондратьева, **М.В. Егорова**, С.А. Афанасьев // **Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: материалы пятой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / под ред. проф. В.А. Шурупия.** - Новосибирск, 2011. - С. 100-101.
30. Нарушение энергетического метаболизма миокарда при сердечной недостаточности и сахарном диабете в эксперименте / Д.С. Кондратьева, **М.В. Егорова**, С.А. Афанасьев, С.В. Попов, Р.С. Карпов // **Актуальные проблемы медицины: материалы XII научно-практической конференции / под ред. О.В. Штыгашевой.** - Абакан: Изд-во ГОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова», 2011. - С. 148-152.
31. Сократительная активность и энергетический метаболизм постинфарктного сердца на фоне диабетического поражения в эксперименте / Д.С. Кондратьева, **М.В. Егорова**, С.А. Афанасьев, Т.Ю. Реброва, С.В. Попов // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2011. – Т. 26. – № 2 (1). – С. 136-139.
32. Особенности энергетического метаболизма кардиомиоцитов при постинфарктном кардиосклерозе и сахарном диабете в эксперименте / С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева, **М.В. Егорова** // **Сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания. Современные подходы к диагностике и лечению: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Томск, 24-26 октября 2012 г.** – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2012. – С. 13-15.
33. **Егорова, М. В.** К вопросу о метаболической терапии при патологиях сердца / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания. Современные подходы к диагностике и лечению: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Томск, 24-26 октября 2012 г.** – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура» – 2012. – С. 67-69.
34. **Егорова, М. В.** Кардиопротекторные механизмы с участием жирных кислот / М.В. Егорова // **VII Сибирский съезд физиологов. Материалы съезда / под ред. Л.И. Афтанаса, В.А. Труфакина, В.Т. Манчука, И.П. Артюхова.** – Красноярск, 2012. – С.168-169.
35. **Егорова, М. В.** Механизмы разобщения дыхания в митохондриях сердца при развитии стрептозотоцин-индуцированного диабета на фоне

- экспериментального инфаркта / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2012. – Т. 27. – № 1. – С.115-118.
36. **Егорова, М. В.** Регуляторная роль свободных жирных кислот в поддержании мембранного гомеостаза митохондрий сердца при экспериментальной ишемии миокарда / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Бюллетень сибирской медицины** (ИФ РИНЦ 0,351). – 2012. – № 3. – С. 31-38.
37. **Егорова, М. В.** Спорные вопросы метаболической терапии при ишемии миокарда / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // Всероссийская конференция «Противоречия современной кардиологии: спорные и нерешенные вопросы», г. Самара, 24-25 ноября 2012 г. - С. 95-96.
38. Сравнительный анализ изменений в структуре миокарда при раздельном и сочетанном постинфарктном и диабетическом поражении сердца / **М.В. Егорова**, Н.В. Крахмаль, С.А. Афанасьев, Ю.В. Роговская, С.В. Попов // **Фундаментальные исследования** (ИФ РИНЦ 0,322). – 2013. – № 7, вып. 1. – С. 77-82.
39. Изменение гормонального статуса крыс и выраженность стресс-реакции при экспериментальном постинфарктном и диабетическом поражении миокарда / **М.В. Егорова**, Т.Ю. Реброва, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // **Фундаментальные исследования** (ИФ РИНЦ 0,322). – 2013. – №7, вып. 1. – С. 83-86.
40. Сравнительное исследование изменений энергетического метаболизма в кардиомиоцитах крыс при постинфарктном кардиосклерозе и сахарном диабете / С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева, **М.В. Егорова**, С.В. Попов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины** (ИФ РИНЦ 0,558). – 2013. – Т. 156. – № 8. – С. 149-152.
41. **Егорова, М. В.** Проявление эффекта кросс-адаптации при сочетанном повреждении миокарда / М.В. Егорова, М.А. Медведев // XXII съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова: тезисы докладов. – Изд-во ВолГМУ, 2013. – с. 162.
42. Анализ модулирующего влияния арахидоновой кислоты на метаболизм миокарда в норме и при патологии / Е. А. Коровина, **М.В. Егорова** // XXII съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова: тезисы докладов. – Изд-во ВолГМУ, 2013. – с. 248.

#### Список использованных сокращений

АДФ – аденозиндифосфат;  
 АКТГ – адренокортикотропный гормон;  
 АТФаза – аденозинтрифосфатаза  
 АФК – активные формы кислорода;  
 БФБ – бромфенацилбромид;  
 кАтр – карбоксиатрактилат;  
 ЛДГ – лактатдегидрогеназа;  
 НАД – никотинамидадениндинуклеотид;  
 ТГ – триглицериды;

ЩФ – щелочная фосфатаза;  
 ЭДТА, ЭГТА – этилендиаминтетраацетат  
 натрия и этиленгликольтетраацетат;  
 HIF-1 – индуцируемый гипоксией фактор;  
 МРТР – mitochondrial permeability transition  
 pore (митохондриальная пора повышенной  
 проницаемости);  
 УСР – uncoupling proteins, разобщающие  
 белки в митохондриях.

## БЛАГОДАРНОСТИ

За все время выполнения настоящего исследования, автор ощущал моральную поддержку множества окружающих его людей: это коллеги по работе, студенты, родственники, друзья. Удивительно благожелательная атмосфера сохранялась на протяжении всего времени выполнения этой работы.

В первую очередь - глубокая благодарность моему дорогому начальнику и научному консультанту, заведующему кафедрой нормальной физиологии, доктору медицинских наук, профессору, академику РАМН, заслуженному деятелю науки РФ Михаилу Андреевичу Медведеву.

Моя глубочайшая признательность заведующему лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии СО РАМН, доктору медицинских наук, профессору Сергею Александровичу Афанасьеву.

Огромная благодарность декану педиатрического факультета СибГМУ, Василию Борисовичу Студницкому, за его дружескую поддержку и веру в автора, как научного исследователя.

Особая благодарность моим коллегам и соавторам, научным сотрудникам НИИ кардиологии СО РАМН, Дине Степановне Кондратьевой и Татьяне Юрьевне Ребровой, оказавшим неоценимую помощь в выполнении данной работы.

Отдельная благодарность моим помощникам-труженикам, Елизавете Сергеевне Алексеевской и Татьяне Викторовне Андреевой (Куцыковой), студенткам, ныне обучающимся в аспирантуре.

Огромная благодарность всем моим коллегам по кафедре за атмосферу сплоченности и поддержки.

С искренней признательностью благодарю за консультации доцента кафедры эндокринологии и диабетологии СибГМУ Татьяну Владимировну Саприну.

В заключение хочется высказать свою благодарность еще многим коллегам, чьи добрые слова, поступки или отношение, так или иначе, помогли мне в выполнении работы:

Байкову Александру Николаевичу, Брустовецкому Николаю Нисоновичу, Васильеву Владимиру Николаевичу, Ковалеву Игорю Викторовичу, Ласуковой Татьяне Викторовне, Легоминовой Татьяне Георгиевне, Логвинову Сергею Валентиновичу, Мильто Ивану Васильевичу, Новицкому Вячеславу Викторовичу, Огородовой Людмиле Михайловне, Петровой Ирине Викторовне, Поляковой Ирине Петровне, Рязанцевой Наталье Владимировне, Сухановой Галине Алексеевне, Суходоло Ирине Владимировне, Хлусовой Марине Юрьевне и многим другим;

И, конечно же, огромная благодарность моим многоуважаемым рецензентам и оппонентам, взявшим на себя нелегкий труд изучения и оценки настоящей работы.