

УДК 611.018.63-091.8:615.212

## УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КАРДИОМИОЦИТАХ ПОСЛЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОЙ ДОЗЫ АЦЕТАМИНОФЕНА И ЕГО СОЧЕТАНИЯ С ТАУЦИНКОМ

Р.И. Кравчук, к.б.н.; В.М. Шейбак, д.м.н., доцент; А.Э. Капитонов;

П.А. Суходольский

ЦНИЛ

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Пятикратное введение животным токсической дозы ацетаминофена приводит к умеренно выраженным ультраструктурным изменениям сердечной мышцы. Основные изменения регистрируются со стороны митохондрий – компенсаторная гипертрофия органелл, сопровождаемая их деструкцией, увеличение числа митохондрий атипичной формы. Введение ацетаминофена не приводит к нарушению целостности сарколеммы и вызывает резко выраженные изменения со стороны микроциркуляторного русла.*

*Одновременное введение с ацетаминофеном тауцинка препятствует нарушению ультраструктуры митохондрий и, вероятно, оказывает стимулирующее влияние на кровоснабжение органа.*

**Ключевые слова:** ацетаминофен, сердце, ультраструктура, тауцинк.

*A five-time administration of acetaminophen leads to moderate ultrastructural changes in heart muscle. Main changes are observed in mitochondria – the compensatory hypertrophy of organoids, accompanied by their destruction and increased number of mitochondria of atypical form. Administration of acetaminophen does not lead to disruption of sarcolemma integrity and causes feebly pronounced changes of microcirculatory flow.*

*Simultaneous administration of taurine prevents mitochondrial ultrastructural changes and is likely to cause stimulation of organ blood supply.*

**Keywords:** acetaminophen, heart, ultrastructure, taurine.

### Введение

Ацетаминофен (парацетамол) всасывается в желудочно-кишечном тракте путем пассивной диффузии в неконъюгированном виде независимо от pH среды. Через 1 ч после приема внутрь до 80% дозы препарата поступает в плазму крови. Одновременно он увеличивает биодоступность других лекарственных средств, которые метаболизируются путем неконкурентного связывания с сульфогликокуроновыми группами, в частности, с половыми гормонами и пероральными контрацептивами [2]. Благодаря широкому спектру фармакологических свойств ацетаминофена и возможности комбинировать его с другими фармакологически активными субстанциями, суточная доза препарата может достигать до 5 г [8]. В последние годы появляется все больше доказательств того, что многофакторное воздействие ацетаминофена на организм в случае поступления токсических доз может приводить к негативным реакциям со стороны внепеченочных тканей [8, 11]. Следствием потребления больших доз ацетаминофена является гипокалиемия, оказывающая негативное действие на функцию многих органов, в том числе сердца [7, 10].

В противоположность этим данным показано, что ацетаминофен обладает кардиопротекторным действием, препятствует повреждению сердечной мышцы в условиях ишемии и/или реперфузии, обусловленных гипоксией и реоксигенацией, а также накоплением пероксинитрита [6]. Авторы отмечают, что ацетаминофен стабилизирует митохондрии в условиях гипоксии. В экспериментах *in vitro* показано, что ацетаминофен (0.35 mM) уменьшал активность процессов апоптоза в ишемизированном миокарде. Используя методы электронной микроскопии, авторам удалось показать торможение ацетаминофеном образования пор в митохондриальной мембране что, как предполагают, предшествует развитию апоптоза кардиомиоцитов. Хотя с помощью методов световой микроскопии не всегда можно выявить

морфологические изменения, соответствующие тонким и динамичным изменениям структуры и функции органа или ткани, очевидно, что начальным проявлениям патологического процесса должны сопутствовать ультраструктурные изменения в основных компартаментах клеток. Учитывая развитие общетоксического эффекта после поступления чрезмерных количеств ацетаминофена в организм, развивающегося вследствие торможения основных биосинтетических процессов, необходимо уточнить информацию о наличии или отсутствии в подобных ситуациях изменений со стороны сердечной мышцы. В литературе подобных сведений нами не обнаружено. Одновременно, учитывая осморегуляторные свойства таурина, основанные на регуляции потоков катионов, главным образом, кальция, в том числе и в кардиомиоцитах, а также известных данных о его положительных свойствах (особенно в сочетании с солями цинка) [1, 9, 12], нами исследован вариант возможной протекции в отношении кардиомиоцитов в ситуации воздействия на организм животного токсической дозы ацетаминофена.

### Материалы и методы

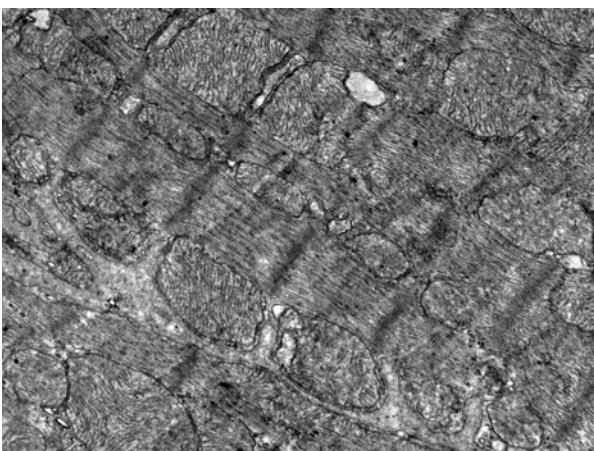
Эксперименты проведены на 15 половозрелых крысах-самках: контрольная и две опытные группы. Животные 1-й подопытной группы получали через 1 день пятикратно внутрижелудочно ацетаминофен в дозе 1500 мг/кг массы. Животные 2-й опытной группы, помимо ацетаминофена, одновременно внутрижелудочно получали «тауцинк» (композицию, состоящую из таурина и цинка сульфата) в дозе 400 мг/кг ежедневно в течение 10 дней.

Для стандартизации техники методов электронно-микроскопического исследования из многих способов забоя животных для морфологического исследования сердечной мышцы нами выбрана декапитация. При этом в ткани сердца возникает наименьшее количество артефактов, связанных с забоем [4]. После извлечения из грудной клетки сердце осторожно отсекали от окружающих

тканей и помещали на лед до полной остановки сердцебиения. Острой бритвой рассекали левый желудочек через стенку правого желудочка и межжелудочковую перегородку. Для количественного морфологического анализа использовали левые папиллярные (сосочковые) мышцы, которые удобны для исследования из-за строгой продольной ориентации в них сердечных миоцитов. В папиллярных мышцах развиваются такие же морфологические изменения, что и в сократительном миокарде левого желудочка [3]. После измельчения образцы ткани помещали в свежую порцию осмиевого фиксатора (общее время фиксации 2 часа, при 4°C) и далее по стандартной методике проводили дегидратацию и заключение в эпоксидную смолу. Полутонкие и ультратонкие срезы приготавливали на ультрамикротоме MT-7000. Электронно-микроскопические препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 и фотографировали с помощью вмонтированной цифровой камеры Olympus MegaView III при увеличениях 5-60 тысяч. Для морфометрического анализа использовалась компьютерная программа «iTEM». Определяли количество профилей срезов митохондрий (численная плотность митохондрий) ( $N$ ) на 12 полях зрения цифровой камеры (площадь одной цифровой фотографии составляет 31,649  $\mu\text{м}^2$ ); площадь, приходящуюся на эти профили органелл ( $S$ ), и рассчитывали на площадь, равную 100  $\mu\text{м}^2$ ; среднюю площадь одной митохондрии ( $S_1$ ). Полученные результаты обработки при помощи пакета программ "Statistica 6.0".

#### Результаты и обсуждение

В контрольной группе животных волокна сердечной мышцы состояли в основном из миофибрилл, между которыми находилась саркоплазма (рис. 1). Сердечная мышца богата митохондриями, что отражает ее значительную потребность в энергии. Митохондрии отличались полиморфизмом, но чаще имели овальную форму, содержали многочисленные, как правило, параллельно ориентированные и плотно расположенные кристы. Матрикс митохондрий характеризовался умеренной электронной плотностью. Подобная морфологическая картина свидетельствует о высокой энергетической и биосинтетической активности митохондрий. Локально митохондрии приобретали квадратную форму с концентрически расположенными кристами (см. рис. 1). В части митохондрий (20-30%) – кристы не отчетливые, расплывчатые. Периодически встречались гипертрофированные



**Рисунок 1 – Контроль. Миофибриллы сердечной мышцы. Многочисленные митохондрии (Mx), отличающиеся полиморфизмом. Темные А-диски (А), отчетливые Z-пластинки (Z) в I-дисках (I). Ув. X 20 000**

формы митохондрий. Отмечался тесный топографический контакт митохондрий с ядром и между собой. Передние митохондрии очень плотно контактировали с ядром, вследствие чего кариолема образовывала глубокие инвагинации.

Ядра кардиомиоцитов отличались крупными размерами, как правило, удлинённой формой, реже овальной. Хроматин мелкозернистый (деконденсированный), с отложением по периферии конденсированного хроматина. На сечении срезов ядер выявлялось одно или два ядрышка, одно из которых крупное, центрально расположенное в кариоплазме, с преимущественно гранулярным компонентом. Ядерные поры широкие, но не многочисленные.

В саркоплазме между митохондриями обнаруживались единичные, иногда более многочисленные розетки гликогена, немногочисленные цистерны саркоплазматического ретикулума, который в сердечной мышце слабо развит. В кардиомиоцитах интактного миокарда элементы зернистого саркоплазматического ретикулума, как правило, не встречаются. Выявлялись компоненты комплекса Гольджи, представленные отчетливыми цистернами и концевыми мешочками, а также единичные, мелкие липидные включения и лизосомы. При анализе сократительных кардиомиоцитов отчетливо регистрировались темные А-диски и гораздо менее отчетливо – I-диски, в которых хорошо выявлялись Z-пластинки (см. рис. 1).

Границы кардиомиоцитов образуют вставочные диски, имеющие ступенчатый профиль и состоящие из поперечных участков (расположенных под прямым углом к длинной оси волокна на уровне Z-пластинок) и продольных (лежащих параллельно оси волокна). В поперечных участках вставочных дисков имелись межклеточные десмосомоподобные соединения и небольшие щелевые контакты. Соединительно-тканые комплексы обеспечивают прочное соединение клеток и играют главную роль в проведении импульсов по волокнам сердечной мышцы. Соединительные комплексы в составе вставочных дисков сердечной мышцы контрольных животных были не всегда четко выражены. В клетках сердечной мышцы на уровне Z-пластинок внутрь клеток входят T-трубочки, которые проводят двигательные импульсы в глубину клетки, что обеспечивает одновременное сокращение всех миофибрилл. На электронно-микроскопических препаратах T-трубочки не всегда отчетливо видны. В эндомиэзии располагались кровеносные капилляры. В цитоплазме эндотелиальных клеток содержалось различное количество пиноцитозных пузырьков и кавеол (микровпячиваний внутрь отростков эндотелиальных клеток со стороны кровеносного капилляра). Ядра эндотелиальных клеток удлиненной формы, с отложением периферического конденсированного хроматина. Кариолема ядер инвагинирована.

В препаратах сердечной мышцы животных, получавших ацетаминофен, регистрировалось несколько более плотное, чем в контроле, расположение митохондрий. Встречались набухшие митохондрии с волнистыми очертаниями наружной мембраны и чаще, чем в контроле, наблюдались митохондрии с неотчетливыми кристами, а также атипичные, гипертрофированные формы органелл (рис. 2). Во многих митохондриях отмечалось неупорядоченное расположение крист и уменьшение их количества. Однако подобная картина местами регистрировалась в кардиомиоцитах и в контрольной группе животных. Проведенный морфометрический анализ показал, что введение ацетаминофена приводит к увеличению сред-



**Рисунок 2 – Ацетаминофен. Набухшие митохондрии с волнистыми очертаниями наружных мембран.**  
Ув. X 20 000

**Таблица 1 – Морфометрические данные ультраструктурных показателей митохондрий кардиомиоцитов (M±m).**

	Контроль n=5	Ацетаминофен n=5	Ацетаминофен + Тауцинк n=5
Si – средняя площадь 1 митохондрии (мкм <sup>2</sup> )	0,450±0,0194	0,522±0,0307	0,422±0,0338*
S – площадь всех профилей митохондрий (мкм <sup>2</sup> ) на площади сечения срезов 100 мкм <sup>2</sup>	37,85±2,357	36,30±2,230	29,25±1,332*•
Ni – численная плотность митохондрий на площади сечения срезов 100 мкм <sup>2</sup>	85,65±6,352	70,45±3,82*	73,71±6,078

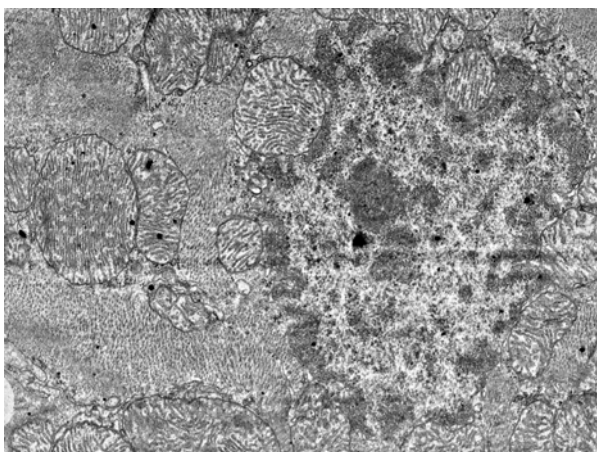
*Примечание:* \* - p<0,05 относительно контрольной группы; • - p<0,05 относительно группы «ацетаминофен»

ней площади одной митохондрии, но уменьшает количество митохондрий в единице площади среза (таблица 1). При этом поверхностная площадь всех митохондрий в единице среза не изменялась. Таким образом, морфометрические данные свидетельствуют о том, что при воздействии ацетаминофена происходит компенсаторная гипертрофия митохондрий, вероятно, связанная с возросшей энергетической потребностью сердечной мышцы. Локально в кардиомиоцитах наблюдалось большее,

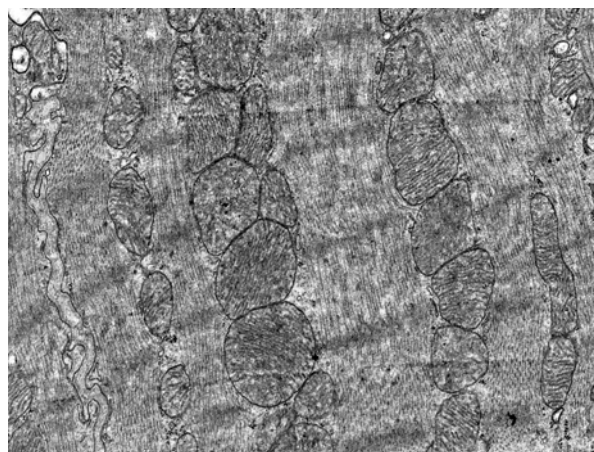
чем в контроле, количество цистерн саркоплазматического ретикулума. Ядра кардиомиоцитов были, как правило, удлинённой формы, но встречались и полигональной формы (рис. 3), с агрегацией хроматина в кариоплазме и по периферии. Ядрышко компактное, чаще одно, центрально расположенное, с преимущественно гранулярным компонентом.

Во вставочных дисках чаще, чем в контроле, были отчетливо выражены соединительные комплексы, особенно десмосомоподобные соединения. В цитоплазме эндотелиоцитов, выстилающих капилляры, так же как и в контроле, выявлялось различное количество пиноцитозных пузырьков и кавеол. Местами отмечалось истончение отростков эндотелиальных клеток. Каких-либо нарушений со стороны сарколеммы не обнаружено. Известно, что целостностью сарколеммы определяется экскреция ионизированного кальция из клетки [4]. Таким образом, очевидно, что ацетаминофен в токсической дозе 1500 мг/кг индуцирует нерезко выраженные ультраструктурные изменения в сердечной мышце.

При одновременном внутрижелудочном введении тауцинка также отмечены некоторые изменения со стороны митохондрий. Большинство митохондрий характеризовалось овальной формой, меньше выявлялось гипертрофированных митохондрий и органелл атипичной формы (рис.4). Практически не обнаруживались митохондрии с волнистыми очертаниями наружной мембраны, как это имело место при введении только ацетаминофена. Кроме того, нормализовался средний размер одной митохондрии (см. табл. 1). Соответственно уменьшалась площадь сечения всех профилей митохондрий на тестируемой площади. При этом численная плотность органелл на единице площади (N<sub>i</sub>) не изменялась по сравнению с группой «ацетаминофен». Морфометрические данные согласуются с регистрируемыми ультраструктурными изменениями в кардиомиоцитах и вышеуказанные ультраструктурные признаки косвенно могут свидетельствовать о снижении энергетики в сердечной мышце, в связи с уменьшением токсического эффекта ацетаминофена при его сочетанном введении с «тауцинком». Существенных различий в степени развития саркоплазматического ретикулума в этой группе животных не отмечено. В то же время в саркоплазме кардиомиоцитов регистрировалось больше липидных включений, часто в тесном контакте с митохондриями, и одновременно, местами, наблюдалось некоторое уменьшение количества гликогеновых розеток, хотя последний признак очень не-



**Рисунок 3 – Ацетаминофен. Ядро полигональной формы в кардиомиоците.** Ув. X 20 000



**Рисунок 4 – Ацетаминофен и Тауцинк. Митохондрии преимущественно овальной формы с умеренно-плотным матриксом.** Ув. X 20 000

постоянный и отмечался и в других экспериментальных группах. Ядра кардиомиоцитов сердечной мышцы животных второй опытной группы в основном были удлиненной формы, однако имели, как правило, не компактное, а крупное ядрышко. Чаше, чем в сердечной мышце контрольных животных и животных, которым вводили только ацетаминофен, обнаруживались кровеносные капилляры, что может свидетельствовать о более активной их пролиферации, а значит об улучшении кровоснабжения сердечной мышцы. В цитоплазме эндотелиоцитов, выстилающих капилляры, так же как и в контрольной и 1-й опытной группе выявлялось различное количество пиноцитозных пузырьков и в то же время в части эндотелиоцитов – большее число кавеол.

В саркоплазме кардиомиоцитов среди митохондрий нередко обнаруживались резидуальные тельца в виде электронно-плотных структур. Соединительно-тканые комплексы вставочных дисков на границе клеток сердечной мышцы были аналогичны таковым в контрольной группе, т.е. не наблюдались утолщенные и уплотненные десмосомоподобные соединения, как в группе животных, получавших только ацетаминофен.

### Заключение

Таким образом, проведенное нами исследование позволяет сделать следующее заключение: пятикратное введение животным токсической дозы ацетаминофена приводит к умеренно выраженным ультраструктурным изменениям сердечной мышцы. Основные изменения регистрируются со стороны митохондрий – компенсаторная гипертрофия органелл, сопровождаемая их деструкцией, увеличение числа митохондрий атипичной формы. Введение ацетаминофена не приводит к нарушению целостности сарколеммы и вызывает нерезко выраженные изменения со стороны микроциркуляторного русла.

Одновременное введение с ацетаминофеном тауцина препятствует нарушению ультраструктуры митохондрий и, вероятно, оказывает стимулирующее влияние на кровоснабжение органа. Некоторое увеличение количества липидных включений в кардиомиоцитах можно рассматривать как источник дополнительного энергообеспечения в условиях негативного воздействия ацетаминофена.

### Литература

1. Влияние композиции, состоящей из таурина и цинка сульфата на уровень свободных аминокислот плазмы крови и печени / В.М. Шейбак [и др.] // Эксп. и клин. фармакол. – 2007. – Т.70, №5. – С.27-29
2. Зупанец, И.А. Парацетамол – преимущества и недостатки при терапии дистрофически-деструктивных заболеваний соединительной ткани / И.А. Зупанец, В.А. Туляков // Эксп. и клин. фармакол. – 2005. – Т.65, №1. – С.74-78.
3. Непомнящих, Л.М. Патологическая анатомия и ультраструктура сердца / Л.М. Непомнящих.- Новосибирск: Наука, 1981. – 324 с.
4. Семенова, Л.А. Ультраструктура мышечных клеток сердца при очаговых метаболических повреждениях / Л.А. Семенова, Ю.Г. Целариус.- Новосибирск, 1978. – 143 с.
5. Шаров, В.Г. Роль сарколеммы в морфогенезе острой сердечной недостаточности / В.Г. Шаров // Бюлл. ВКНЦ АМН СССР. – 1988.- №1.- С.48-61.
6. Acetaminophen-mediated cardioprotection via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore-induced apoptotic pathway / N.M. Hadzimichalis [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2007. – Vol.293, N6. – P.3348-3355.
7. Acute acetaminophen overdose is associated with dose-dependent hypokalaemia: a prospective study of 331 patients / W.S. Waring [et al.] // Basic Clin Pharmacol Toxicol. – 2008. – Vol.102, N3. – P.325-328.
8. Chen, L. Knowledge about acetaminophen toxicity among emergency department visitors / L. Chen, S. Schneider // Vet. Hum. Toxicol. – 2002. – Vol.44, N6. – P.370-373.
9. Idrissi, A. Taurine regulates mitochondrial calcium homeostasis / A. Idrissi, E. Trenkner // Adv. Exp. Med. Biol. – 2003. – Vol.526. – P.527-536.
10. Pakravan, N. Effect of acute paracetamol overdose on changes in serum and urine electrolytes / N. Pakravan, D.N. Bateman, J. Goddard // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2007 – Vol.64, N6. – P.824-832.
11. Tran, T.T. The release of DNA into the plasma of mice following hepatic cell death by apoptosis and necrosis / T.T. Tran, P. Groben, D.S. Pisetsky // Biomarkers – 2008. – Vol.13, N2. – P.184-200.
12. Waters, E. Role of taurine in preventing acetaminophen-induced hepatic injury in the rat / E. Waters, J. Wang, H. Redmond / Am. J. Physiol. Gastroenterol. Liver Physiol. – 2001. – Vol.280, N6. – P.1274-1279.

Поступила 16.09.2010