

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Иванченко М.В., Твердохлеб И.В., 2014

УДК 611.127:611.018:576.311.347

**ХАРАКТЕР ОБРАЗОВАНИЯ МЕЖМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ КОНТАКТОВ
В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ФОРМИРОВАНИЯ
МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АППАРАТА В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ
ГИПОКСИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ КАРДИОГЕНЕЗА**

М.В. Иванченко, И.В. Твердохлеб

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»,
г. Днепропетровск, Украина

Целью работы является определение характера образования межмитохондриальных контактов в процессе онтогенетического формирования митохондриального ретикулула кардиомиоцита и степени ассоциирования органелл в условиях предшествующего действия внутриутробной гипоксии. Проведённый анализ показал, что в норме уровень ассоциирования митохондрий различный в зонах клетки, обусловлен гетерогенностью митохондрий и изменяется на этапах онтогенеза. Воздействие внутриутробной гипоксии и окислительного стресса приводит к реакции митохондрий, которая отражается на характере образования между органеллами межмиофибриллярной, парануклеарной и субсарколеммальной локализации межмитохондриальных контактов.

Ключевые слова: крысы, миокард, кардиогенез, ультраструктура митохондрий, межмитохондриальные контакты, внутриутробная гипоксия.

В эукариотических клетках митохондрии являются высокодинамичными органеллами, которые постоянно подвергаются изменениям формы и размеров путём слияния и деления. В зрелых кардиомиоцитах (Кмц) млекопитающих митохондрии занимают 30-40% объёма клетки и строго организованы между пучками миофиламентов (межмиофибриллярная (ММФ) субпопуляция), под сарколеммой (субсарколеммальная (ССМ) субпопуляция), и вблизи ядра (парануклеарная (ПН) субпопуляция). Митохондриальный аппарат представлен упорядоченной сетью органелл, которая по структуре подобна кристаллической решётке, что, вероятно, ограничивает динамику митохондрий и затрудняет процессы их слияния и деления [10]. Такие особенности расположения свидетельствуют о том, что митохондрии Кмц объединены друг с другом структурно и энергетически.

Значительный интерес морфологов вызывает образование особой внутриклеточной системы сердечного миоцита – протяженных митохондриальных кластеров, являющихся результатом непосредственного соединения митохондрий в единую структурно-функциональную систему. Используя зелёный фотоактивируемый флуоресцентный белок (PAGFP) в сочетании с конфокальной микроскопией, группа исследователей [9] показала, что они взаимодействуют друг с другом посредством образования случайных межмитохондриальных контактов (ММК), объединяющих их в небольшие группы – кластеры, или образуют длинную трёхмерную цепь, где звеном является отдельная митохондрия. Такая сложно организованная сеть митохондрий, которую называют «митохондриальный ретикулум», располагаясь в саркоплазматиче-

ском пространстве мышечной клетки, формирует своеобразный мембранный каркас, в котором постоянно происходят процессы обмена содержимым матрикса митохондрий [9]. Это позволяет рассматривать митохондриальный аппарат, где органеллы соединены ММК, как мембранный внутриклеточный кабель, благодаря которому возможно быстрое распространение энергии в клетке [5].

Однако при интерпретации данных ультраструктурных исследований необходимо принимать во внимание, что в культуре клеток и в развивающихся незрелых Кмц имеются условия для осуществления митохондриями процессов деления, слияния и движения [3]. Особенности строения таких Кмц не позволяют с полной уверенностью утверждать о структурно-функциональной связи органелл [11]. Так же мало изученным остаётся характер образования ММК в процессе онтогенетического формирования митохондриального ретикула Кмц и степени ассоциирования органелл в условиях действия гипоксии.

Материалы и методы

Исследования выполнены на белых беспородных крысах-самках и их потомстве. В качестве материала исследования были использованы сердца потомства на разных этапах постнатального онтогенеза. Хроническую пренатальную гипоксию моделировали на беременных самках путём внутрибрюшинного введения 1%-ного раствора нитрита натрия с 10-х по 21-е сутки беременности в дозе 5 мг/100 г веса (доза, вызывающая гипоксию средней степени тяжести) [2]. Контрольным животным вводили внутрибрюшинно 1 мл 0,9%-ного физиологического раствора натрия хлорида.

Исследование проведено в соответствии с законодательством Украины (Закон Украины «О защите животных от жестокого обращения» от 15.12.2009 года № 1759-VI), правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных исследованиях.

Полученные образцы различных участков миокарда подготавливали для электронно-микроскопического исследо-

вания по стандартной методике [7]. Исследования проводили в лаборатории электронной микроскопии ГУ «ДМА МЗ Украины» с помощью трансмиссионного электронного микроскопа ПЭМ-100-01 («SELMI», Украина) при ускоряющем напряжении 75-80 кВ и первичных увеличениях от 2000 до 80000.

Количественную оценку ультраструктурных изменений проводили путем подсчёта ММК на 100 митохондрий. Определение достоверности различий между выборками проводили с учётом парного t-критерия Стьюдента, а также непараметрического критерия Уилкоксона в случае отсутствия нормального статистического распределения величин. Полученные результаты обрабатывали с помощью лицензионной программы Statistica 6.1.

Результаты и их обсуждение

Электронно-микроскопический анализ ММФ, ССМ и ПН зон зрелых Кмц показал, что митохондрии были полиморфны. ММФ зона Кмц в основном была представлена органеллами относительно большого объёма и площадью наружной митохондриальной мембраны. Они имели удлинённую форму, упорядоченную ориентацию крист и умеренно плотный матрикс. Такие митохондрии располагались строгими рядами между миофибриллами, преимущественно их длина соответствовала длине саркомера. ССМ зона клетки характеризовалась наличием полиморфных митохондрий. Среди них были органеллы большого объёма, имеющие вытянутую или шарообразную форму, упорядоченную ориентацию крист и умеренно плотный матрикс. Как правило, такие митохондрии располагались под сарколемой вблизи обменного сосуда. Определялись органеллы меньшие по объёму, по площади поверхности наружной и внутренней митохондриальной мембран и количеству слабо ориентированных крист. Также были небольших размеров митохондрии, количество и соответственно плотность крист в которых значительно превышала аналогичные показатели других типов митохондрий. ПН зона сократительных Кмц была представлена преимуще-

щественно митохондриями с ультраструктурными признаками умеренной функциональной активности: небольших размеров шаровидные органеллы, с просветлённым

матриксом и небольшим количеством сниженной плотности слабо ориентированных крист (рис. 1).

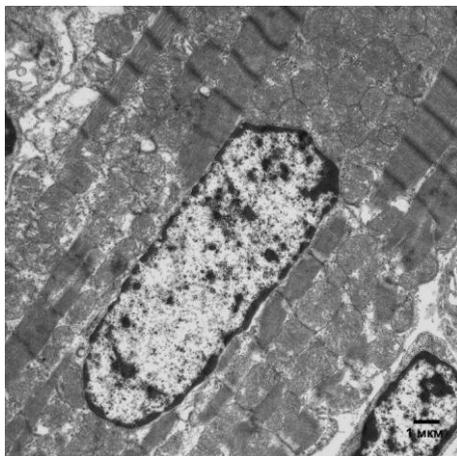


Рис. 1. Субпопуляции митохондрий ММФ, ПН и ССМ зон сократительного Кмц левого желудочка сердца зрелой крысы в норме. Электронограмма

Указанная гетероморфность митохондрий не только зональная, а имеет метаболическую основу, поскольку данные субпопуляции органелл отличаются своими функциональными свойствами, то есть обладают разной скоростью окислительного фосфорилирования и ферментативной активностью [10]. ММФ субпопуляция митохондрий специализируются на синтезе креатинфосфата, который используется актомиозиновым комплексом в качестве энергетического субстрата [14]. ССМ митохондрии обеспечивают энергией АТФ-зависимые ионные насосы. Кроме того, органеллы этой зоны защищают внутриклеточные структуры от высокой внеклеточной концентрации кислорода, выступая в качестве «защитного барьера» [12]. ПН органеллы, как известно, преимущественно производят АТФ для общеклеточных потребностей, играют важную физиологическую роль в механизмах ядерного импорта, а также регулируют ряд других функций ядра [8].

Ультраструктурный анализ серии электронограмм показал, что многие сосед-

ние митохондрии контактировали друг с другом с помощью ММК (рис. 2А, 2Б). На одну митохондрию приходилось около 2-х, 3-х контактов, что превышает количество характерное для митохондрий миосимпластов скелетной мышечной ткани. Митохондриальные контактные участки характеризовались повышенной электронной плотностью внутренней и внешней мембран, межмембранного пространства, что, вероятно, связано с наличием в этой зоне крупных электронно-плотных белков. Протяжённость контактов в зрелых Кмц составляла 450-650 нм, при этом контур внешних мембран соответствующих митохондрий участками полностью сливался.

Вероятно, такие контакты осуществляют обмен между компонентами мембран, либо белками матрикса. Сапрунова В. Б. и коллеги установили, что в области контактов чётко определяется повышенная цитохром С-оксидазная активность [4]. Подобные контакты были не так давно описаны между митохондриями скелетных мышц [13].

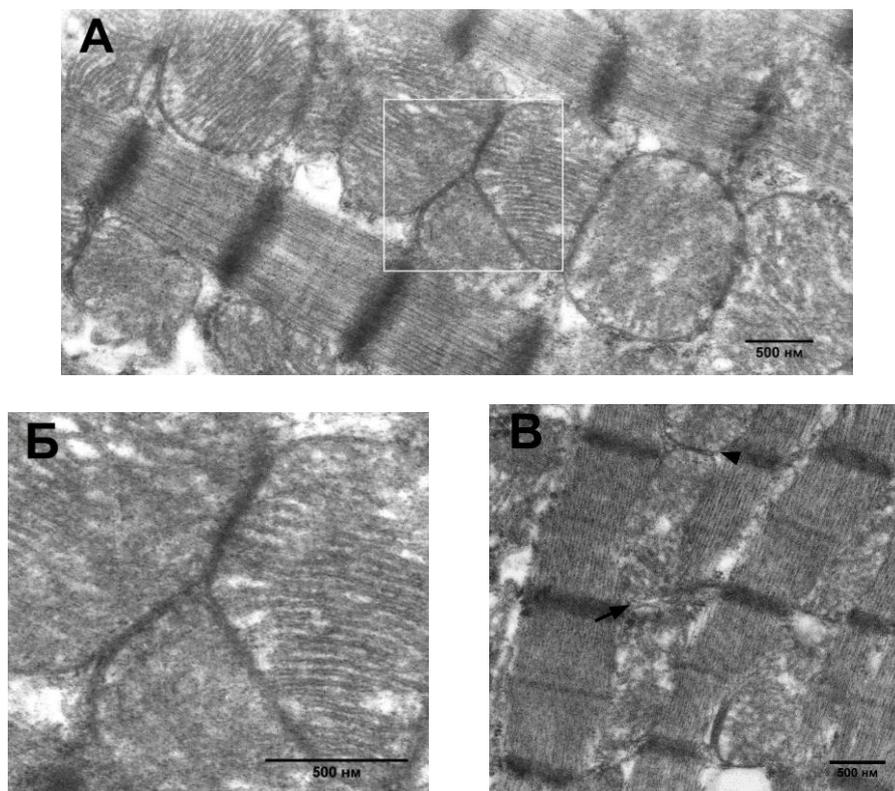


Рис. 2. Митохондриальный аппарат сократительного Кмц левого желудочка сердца зрелой крысы в норме. Электронограмма:

А. Митохондрии ММФ зоны объединены посредством ММК.

Б. В зоне контактного участка повышенная электронная плотность внутренней и внешней мембран, межмембранного пространства. Контур внешних мембран соответствующих митохондрий полностью сливается.

В. Межмитохондриальный «мостик» (стрелка), ММК (головка стрелки)

Исследование ММФ зоны Кмц показало, что митохондрии образовывали классические диады или были представлены группой органелл, что чаще наблюдалось между хорошо развитыми миофибриллами. Внешние мембраны смежных ММФ митохондрий взаимодействовали, формируя ММК на уровне Z-линий. Однако контакты образовывались не только между двумя соседними митохондриями в торцевых зонах, но и между боковыми участками органелл, особенно при групповом расположении митохондрий между миофибриллами (рис. 3). Иногда внешняя митохондриальная мембрана в зоне прилегания двух орга-

нелл вовсе отсутствовала, а этом месте формировался межмитохондриальный «мостик» (рис. 2В), который соединял матрикс обеих митохондрий. Такие «мостики» располагались тоже на уровне Z-линий миофибрилл.

Исследование кластеров митохондрий, которые локализовались вблизи ядра (ПН популяция), показало, что нерегулярно организованные органеллы образовывали больше ММК, чем упорядоченно расположенные митохондрии ММФ зоны. Это говорит о том, что митохондрии объединялись в обширный функциональный митохондриальный ретикулум.

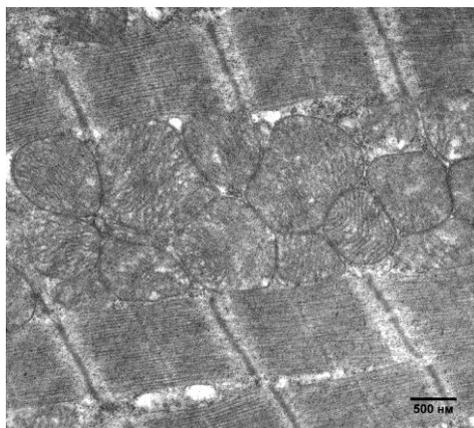


Рис. 3. Митохондрии ММФ зоны сократительного Кмц левого желудочка сердца зрелой крысы в норме. Электронограмма

Изучение особенностей ассоциирования митохондрий в онтогенетическом аспекте в норме и в условиях предшествующего воздействия пренатальной гипоксии показало, что в сократительных Кмц интрамуральной зоны миокарда левого желудочка на всех этапах постнатального развития митохондрии исследуемых зон клетки образовывали между собой контакты. Рост числа ММК при изучении органелл разных зон происходил неодинаково, что связано, видимо, с характером реорганизации внутриклеточной архитектоники, степени функционирования и гетерогенности митохондрий.

Электроно-микроскопическое исследование сократительных Кмц позволило установить, что в норме на 1-й, 3-й день постнатального периода митохондриальный аппарат ещё довольно слабо был развит. Полиморфные органеллы преимущественно располагались под сарколеммой и в ПН зоне, они образовывали ММК более активно, чем митохондрии ММФ локализации. Здесь органеллы ещё не формировали упорядоченную сеть, но уже образовывали единичные ассоциации между собой. Однако уже к концу недели среди митохондрий ММФ зоны наблюдалось увеличение количества органелл с

относительно большим объёмом, площадью внешней митохондриальной мембраны, плотным матриксом, местами между миофибриллами уже на 7-е сутки располагались кластеры органелл. Количество ММК в сравнении с предыдущим сроком развития резко возрастало (в 2,7 раза) и составляло $21,3 \pm 1,3$ (табл. 1). Следует отметить, что в этой зоне клетки в образовании ассоциаций активно принимали участие именно «высокоэнергетические» митохондрии [6].

Ультраструктурный анализ митохондрий в группе новорождённых крыс, которые развивались под влиянием внутриутробной гипоксии, показал, что митохондрии ПН локализации были представлены органеллами небольшого объёма, с неупорядоченными, низкой плотности кристами. Редко среди неизменённых органелл встречались митохондрии с признаками умеренного отёка и с явлениями разрушения крист. Анализ динамики уровня ассоциативности митохондрий демонстрировал достоверное увеличение ММК в ПН зоне относительно группы контроля на 37,7%. В ММФ зоне присутствовали относительно большие митохондрии с умеренно развитыми кристами и плотным матриксом, органеллы с явле-

Таблица 1

Динамика изменений количества ММК митохондрий ММФ, ПН и ССМ зон сократительных Кмц левого желудочка (количество контактов на 100 митохондрий) на этапах постнатального онтогенеза

	ММФ зона		ПН зона		ССМ зона	
	Контроль	Гипоксия	Контроль	Гипоксия	Контроль	Гипоксия
1-й день	4,6±0,9	2,4±0,8*	11,4±1,3	15,7±1,6*	7,1±1,4	6,2±1,3
3 дня	7,8±1,2	3,2±1,1*	18,3±1,4	13,4±1,5	13,7±1,8	4,2±1,3*
7 дней	21,3±1,3	26,4±1,5*	32,6±1,4	42,7±1,6*	28,5±1,3	38,4±1,9*
14 дней	30,7±1,9	41,3±2,3*	36,2±2,1	41,3±2,4	35,7±2,3	49,6±2,6*
30 дней	46,4±2,8	58,6±3,1*	49,2±5,4	53,5±5,7	54,6±4,1	65,3±4,0*
Зрелый возраст	38,2±3,4	41,3±3,5	48,2±4,1	48,6±4,3	48,3±3,8	58,7±4,2*

Примечание: * указывают на достоверное отличие от группы контроля ($p < 0,05$).

ниями отёка и вакуолизации, элементами кристоллизиса и участками вымывания матрикса. При этом митохондрии этой локализации слабо образовывали контакты между собой, показатель был ниже нормы на 47,8% ($p < 0,05$). В ССМ зоне органеллы имели шарообразную или удлинённую форму, прозрачный матрикс, среди них обнаруживались набухшие митохондрии, органеллы с разрушенными кристами и зонами активной вымывания матрикса, часто во внешней мембране некоторых из них наблюдались трещины и разрывы. Исследование количества ММК в этой зоне показало тенденцию отставания от группы контроля, но она была не достоверна. Эти особенности ультраструктуры митохондрий указывали о напряжении энергетического аппарата в этой зоне, а относительная стабильность в характере ассоциирования органелл компенсировала прогрессивно снижающееся количество крист в митохондриях, поддерживая достаточный уровень энергии для функционирования АТФ-зависимых каналов.

Ультраструктура митохондрий на 3-й день характеризовалась полиморфизмом изменений, что в значительной степени отражалось на степени образования митохондриями контактов между собой. ММФ митохондрии имели разный размер, но практически все были в состоянии сильно-

го отёка, о чем свидетельствовало напряжение их внешних мембран. Деградация органелл преимущественно осуществлялась путём разрыва наружной мембраны и утечки матрикса в гиалоплазму. Отмечались признаки распада ассоциаций митохондрий, они слабо образовывали контакты между собой, их количество было снижено по сравнению с группой контроля на 58,9% ($p < 0,05$). В ССМ зоне процессы деградации были более выраженными, они явно превалировали над процессами репродукции органелл. Митохондрии находились в состоянии выраженного отёка, в них наблюдались трещины и разрывы наружной мембраны, деструкция крист и утечка матрикса. Присутствовали лопнувшие, пустые и сморщенные органеллы, мелкодисперсные аморфные массы в гиалоплазме. Митохондрии практически не образовывали ассоциаций между собой, их количество резко падало по сравнению с показателем в 1-й день постнатального периода и достоверно отставало от нормы на 69,3%.

Исследования органелл ПН локализации показало, что митохондрии свободно располагались в гиалоплазме вокруг ядра или образовывали скопления органелл. Они активно образовывали контакты между собой, хотя их количество в сравнении с группой контроля было меньше. Вероятно, такая реакция ПН популяции митохондрий

связана с тем, что даже в условиях развития гипоксически-ишемических [1] изменений в клетке количество контактов в этой зоне сохраняется на достаточном уровне для обеспечения слаженной, полноценной работы митохондрий, обеспечивающих энергией общеклеточные процессы и механизмы, направленные на поддержание функционирования ядра.

Электронно-микроскопический анализ митохондрий Кмц на 7-й день показал, что во всех зонах клетки на фоне изменённых органелл возростала доля небольших митохондрий, с плотным матриксом и плотно упакованными кристами. Степень ассоциирования митохондрий в экспериментальной группе во всех зонах клетки достоверно возростала, при этом в ММФ зоне на 23,9%, в ПН – на 30,9%, в ССМ – на 34,7%, что связано с активизацией процессов репродукции органелл и восстановления пространственно-ориентированной системы митохондриального ретикулума.

На 14-й, 30-й день процессы объединения митохондрий в единую систему продолжались. Количество ММК возростало в целом по клетке, особенно в ММФ и ССМ зонах. При этом исследование сократительных Кмц зрелого миокарда группы эксперимента показало, что в ССМ зоне показатель степени ассоциирования митохондрий оставался достоверно выше и превышал норму на 21,5%.

Выводы

1. В норме уровень ассоциирования митохондрий различный в зонах клетки, обусловлен гетерогенностью митохондрий и изменяется на этапах онтогенеза.

2. Воздействие внутриутробной гипоксии и окислительного стресса отражается на степени образования контактов между митохондриями межмиофибрилярной, парануклеарной и субсарколеммальной локализации в кардиомиоцитах: 3-й день постнатального онтогенеза характеризуется резким снижением количества межмитохондриальных контактов в субсарколеммальной и межмиофибрилярной зонах по сравнению с показателем в 1-й день постнатального периода и

достоверным отставанием количества межмитохондриальных контактов на 69,3% и 58,9% от нормы соответственно; на последующих сроках развития – возростанием показателя в целом по клетке по сравнению с нормой. Характер изменения числа межмитохондриальных контактов в разных зонах клетки указывает на их лабильность, высокую чувствительность при гипоксически-ишемических повреждениях сердца.

Литература

1. Заднипряный И.В. Структурная перестройка миокарда при перинатальной гипоксии в условиях эксперимента / И.В. Заднипряный, О.С. Третьякова // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2011. – Т. 1, № 1. – С. 40-45.
2. Иваницкая Н.Ф. Методика получения разных стадий гемической гипоксии у крыс введением нитрита натрия / Н.Ф. Иваницкая // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1976. – № 3. – С. 69-71.
3. Иванченко М.В. Кількісна ультраструктурна характеристика перебудов мітохондріального апарата скоротливих кардіоміоцитів шлуночків у пренатальному онтогенезі за умов хронічної гіпоксії / М.В. Іванченко // Патологія. – 2013. – № 3. – С. 66-70.
4. Сапрунова В.Б. Выявление цитохром С-оксидазной активности в митохондриях кардиомиоцитов изолированной ткани миокарда при длительном действии / В.Б. Сапрунова, И.М. Солодовникова, Л.Е. Бакеева // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 3. – С. 268-274.
5. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран / В.П. Скулачев. – М.: Наука, 1989. – 564 с.
6. Твердохлеб И.В. Гетерогенность митохондриального аппарата миокарда и механизмы её формирования в раннем онтогенезе крыс / И.В. Твердохлеб // Цитология и генетика. – 1998. – Т. 32, № 2. – С. 8-12.
7. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих: пер. с англ. / Б. Уикли. – М.: Мир, 1975. – 178 с.

8. Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer / P. Dzeja [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99. – P. 10156-10161.
9. Kissing and nanotunneling mediate intermitochondrial communication in the heart / X. Huang [et al.] // Cell Biology. – 2013. – Vol. 110, № 8. – P. 2846-2851.
10. Kuznetsov A.V. Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity / A.V. Kuznetsov, R. Margreiter // Int. J. Mol. Sci. – 2009. – Vol. 10. – P. 1911-1929.
11. Mitochondrial fission and autophagy in the normal and diseased heart / M. Iglewski [et al.] // Curr. Hypertens. Rep. – 2010. – Vol. 12, № 6. – P. 418-425.
12. Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a "crystal-like" pattern / M. Vendelin [et al.] // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2005. – Vol. 288, № 3. – C. 757-767.
13. Picard M. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study / M. Picard, K. White, D. M. Turnbull // J. Appl. Physiol (1985). – 2013. – Vol. 114, № 2. – P. 161-171.
14. Standardized bioenergetic profiling of adult mouse cardiomyocytes / R.D. Readnower [et al.] // Physiol. Genomics. – 2012. – Vol. 44, № 24. – P. 1208-1213.

**THE PECULIARITIES OF INTERMITOCHONDRIAL CONTACTS
DURING ONTOGENETIC FORMATION OF MITOCHONDRIA NETWORK
IN NORMAL AND UNDER HYPOXIC DAMAGE OF CARDIOGENESIS**

M.V. Ivanchenko, I.V. Tverdokhleб

The aim of this work was to determine the formation of intermitochondrial contacts during ontogenesis of mitochondrial reticulum and to evaluate the degree of mitochondria associations under the influence of prenatal hypoxia. In the present study, we analyzed that in normal conditions the number of intermitochondrial contacts was different in areas of the cell and changed to the stages of ontogeny. Influence of intrauterine hypoxia and oxidative stress leads to mitochondrial reactions that affects to the formation between organelles intermitochondrial contacts in the subsarcolemmal, intermyofibrillar and paranuclear regions of ventricle cardiomyocytes.

Keywords: *rat, myocardium, cardiogenesis, ultrastructure of mitochondria, intermitochondrial contacts, chronic hypoxia.*

Иванченко М.В. – преподаватель кафедры гистологии ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепропетровск.
E-mail: docmarinka@gmail.com.

Твердохлеб И.В. – д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой гистологии ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепропетровск.
E-mail: ivt@dsma.dp.ua.