

**М.В.Іванченко
І.В.Твердохліб**

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Ключові слова: міокард, ультраструктура мітохондрій, кардіогенез, щури.

Надійшла: 24.08.2012

Прийнята: 12.09.2012

УДК 611.11:611.018:611.013

УЛЬТРАСТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА МІТОХОНДРІЙ КАРДІОМІОЦИТІВ У РАНЬОМУ КАРДІОГЕНЕЗІ ЩУРІВ

Дослідження проведено у рамках науково-дослідної роботи «Структурні перебудови компонентів серцево-судинної системи в умовах її нормального й аномального гістогенезу у людини й експериментальних тварин» (номер державної реєстрації 0111U006621).

Резюме. Проведено ультраструктурне дослідження мітохондрій міокарда ембріонів щурів на різних етапах пренатального онтогенезу. Показано, що у складі саркоплазми скоротливих кардіоміоцитів визначається значний їх поліморфізм, співвідношення усіх типів мітохондрій на етапах онтогенезу щурів є неоднаковим та суттєво відрізняється від даних скоротливих кардіоміоцитів новонароджених. Встановлено, що розподіл мітохондрій різних типів відрізняється специфічною локалізацією в клітині, що пов'язано з функціональними особливостями цих органел. Протягом пренатального розвитку серця щурів відбувається закономірне збільшення ступеня гетерогенності мітохондріального апарата, причому формування та ступінь його розвитку по відношенню до відділів серця неоднакове. Найбільш активні темпи формування мітохондріуму відбуваються в міокарді лівого та правого шлуночків, найбільш низькі – в передсердному. На етапах раннього кардіогенезу вони реалізуються за рахунок «низькоенергетичних» органел, в подальшому – завдяки значному збільшенню частки «високоенергетичних» мітохондрій.

Морфологія. – 2012. – Т. VI, № 3. – С. 19-25.

© М.В.Іванченко, І.В.Твердохліб, 2012

Ivanchenko M.V., Tverdokhlib I.V. Ultrastructural characteristics of mitochondria in rat cardiomyocytes in the early cardiogenesis.

Summary. We have studied ultrastructure of mitochondria in embryos rat's myocardium at different stages of prenatal ontogenesis. It is shown that in the sarcoplasm of contractile cardiomyocytes determined significant polymorphism of mitochondria, ratio of all types of mitochondria is different of stages of rat's ontogenesis and is significantly different from those of contractile cardiomyocytes of newborns. Established, that the distribution of different types of mitochondria is heterogeneous in specific subcellular localization, due to the functional features of these organelles. During prenatal development of rat heart is regular increase in the degree of heterogeneity of the mitochondrial apparatus. At the same time, the formation and the degree of development in different parts of the heart are not the same. The most active development rates of mitochondrion occur in the myocardium of the left and right ventricles, the lowest – in the atrial, at the early stages of cardiogenesis by the "low-energy" organelles, then, with a significant increase of the "high-energy" mitochondria.

Key words: myocardium, ultrastructure of mitochondria, cardiogenesis, rats.

Вступ

Серцево-судинні захворювання є основною причиною смерті в усьому світі. Серед усіх вроджених вад, за даними ВООЗ, вади серця складають 30%. Вони займають перше місце серед хвороб, які призводять до перинатальної смертності та ранньої інвалідації населення (Comas G.C. et al., 2002; Linde D. et al., 2011; Sharland G., 2012).

Розуміння процесів кардіогенезу тісно пов'язане із правильним тлумаченням механізмів формування різних вроджених аномалій, хвороб, пов'язаних з метаболічними порушеннями у міокарді та кардіоміопатіями. Безумовно, це надасть

можливість впливати на ключові ланки їх розвитку, впроваджувати нові терапевтичні і хірургічні методики корекції та допоможе у вирішенні питань серцевої реабілітації (Нуджент Э.В., 2000; Мутафьян О.А., 2002; Козлов В.О. та співавт., 2003).

Визначення ролі мітохондріального апарата кардіоміоцитів у реалізації нормальних онтогенетичних подій та при розвитку міокарда під впливом різних ушкоджень дозволило довести, що саме мітохондрії є одним з найбільш чутливих компонентів клітини, реакції якого визначають перебіг адаптаційних і альтеративних процесів (Сударикова Ю.В. и соавт., 1997; Tissier R. et

al., 2009, Cadenas S. et al., 2010). Найважливішою особливістю мітохондрій є значна динамічність їх морфології у відповідь на різні зміни клітинного метаболізму. Це стосується не тільки їх форми, розташування, розмірів та кількості, але й, особливо, внутрішньої ультраструктурної організації (Бакеева Л.Е., 2008).

Згідно сучасних уявлень, визначають ультраструктурний та функціональний поліморфізм мітохондрій кардіоміоцитів як при аналізі фізіологічних так і патологічних процесів у серцевій тканині в онтогенетичному аспекті (Твердохлеб І.В., 1996; Сапрунова В.Б. и соавт., 2003; Солодовникова І.М., 2007), проте численні питання, пов'язані з аналізом ультраструктурної гетерогенності мітохондрію, потребують подальшого дослідження.

Вивчення особливостей перебудови мітохондріального апарату у комбінації із сучасними теоретичними уявленнями мітохондріології надзвичайно перспективні в аспекті патоморфогенезу різних форм серцево-судинної патології. Особливо у теперішній час посилюється значення морфологічних досліджень для пренатальної діагностики хвороб серця людини. Безпосереднє спостереження за розвитком серцевих вад у людини неможливе, проте за допомогою експериментальних моделей стає доцільним аналіз змін у серці при формуванні вродженої патології.

Мета даного дослідження полягає в кількісному ультраструктурному аналізі перетворень мітохондріального апарату кардіоміоцитів серця щурів на етапах раннього кардіогенезу в нормі.

Матеріали та методи

В якості матеріалу для даного дослідження були використані серця ембріонів білих щурів лінії Вістар. Ембріональний матеріал експериментальних тварин отримували в лабораторних умовах відповідно до рекомендацій, викладених в довідково-методичному посібнику «Объекты биологии развития» (1975) при використанні відповідних таблиць нормального розвитку.

Отримані зразки різних ділянок міокарда протягом 3-4 годин фіксували при +2°C в 2,5%-ному розчині глутаральдегіду, виготовленому на 0,2М фосфатному буфері (рН 7,4). Подальша фіксація проводилась в 1%-ному забуференому (рН 7,4) розчині OsO₄ («SPI», США) протягом 1 години. Зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації та в пропіленоксиді.

Для виготовлення епоксидних блоків використовували композицію епон-аралдіт. Виготовлення ультратонких зрізів проводили на ультрамікротомі УМТП-6М («SELMI», Україна) з подальшим їх розміщенням на опорних сітках (Mesh Regular Grid 200). Подвійне контрастування проводили за стандартною методикою (методом Рейнольдса).

Дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-100-

01 («SELMI», Україна) при напрузі прискорення 75 кВ і первинних збільшеннях від 2000 до 80000 за стандартною схемою (Саркисов Д.С., 1996; Куо J., 2007).

Кількісну оцінку ультраструктурних змін проводили через підрахунок таких показників: кількісне співвідношення типів мітохондрій, щільність упакування мітохондрій, чисельна щільність мітохондрій, об'єм мітохондрії, коефіцієнт сферичності, площа поверхні зовнішньої і внутрішньої мітохондріальних мембран, щільність мітохондріальних крист, кількість крист мітохондрії, ступінь орієнтації крист. Визначення параметрів ґрунтували на принципах стереологічного аналізу (Автандилов Г.Г., 1990).

Морфометричні дані зазнавали статистичної обробки. Визначення вірогідності розходжень між вибірками проводили з урахуванням параметричного t-критерію Стьюдента, а також непараметричного критерію Вілкоксона у разі відсутності нормального розподілу. Усі необхідні розрахунки виконували за допомогою ліцензійної програми Statistica (версія 6.1; серійний номер AGAR 909 E415822FA).

Результати та їх обговорення

Проведене ультраструктурне дослідження міокарда ембріонів щурів на різних етапах пренатального онтогенезу показало, що у складі саркоплазми скоротливих кардіоміоцитів визначається значний поліморфізм мітохондрій. Вивчення інтегральних параметрів досліджуваних органел надало можливість виявити існування трьох типів мітохондрій (рис. 1, 2).

Мітохондрії 1-го типу представлені органелами з відносно великим об'ємом та площею зовнішньої мітохондріальної мембрани. Вони мають видовжену форму та добре розвинутий апарат крист (рис. 3). Органели 2-го типу мають кулясту форму, дещо менший об'єм та площу поверхні зовнішньої мітохондріальної мембрани. При вивченні морфометричних показників крист з'ясувалось, що за кількістю та щільністю крист, ступенем їх орієнтації такі мітохондрії значно поступаються органелам як 1-го типу, так і 3-го типів, а площа внутрішньої мітохондріальної мембрани майже у 2 рази менша за інші типи мітохондрій (рис. 4). Мітохондрії 3-го типу також мають кулясту форму, але вони невеликі за розмірами та площею зовнішньої мітохондріальної мембрани у порівнянні з першими 2 типами. Важливо відзначити, що в даних органелах показники внутрішньої мітохондріальної мембрани, кількість та відповідно щільність крист значно перевищують аналогічні показники інших типів мітохондрій (рис. 4).

Розподіл мітохондрій різних типів відрізняється значною неоднорідністю відносно внутрішньоклітинної локалізації, що, ймовірно, пов'язано з їх неоднаковим функціональним профілем. Органели, які розташовуються між міофіб-

рилами, представлені мітохондріями 1-го та 3-го типів (рис. 3, 6). При цьому мітохондрій 1-го типу суттєво превають за кількістю та об'ємом, часто ці «високоенергетичні органели» об'єднані за допомогою міжмітохондріальних контактів (ММК) та формують складну систему мітохондріального ретикулума. Мітохондрії 3-го типу виявляються в невеликій кількості в міжміофібрилярних зонах та є органелами, які розви-

ваються. Субсарколемарна локалізація мітохондрій, де процеси обміну речовин добре виражені, представлена мітохондріями усіх трьох типів, але частіше за все зустрічаються субпопуляції мітохондрій 1-го та 2-го типів. Парануклеарна зона скоротливих кардіоміоцитів містить переважно мітохондрії з ультраструктурними ознаками помірної функціональної активності – 2-го типу (рис. 4, 5).

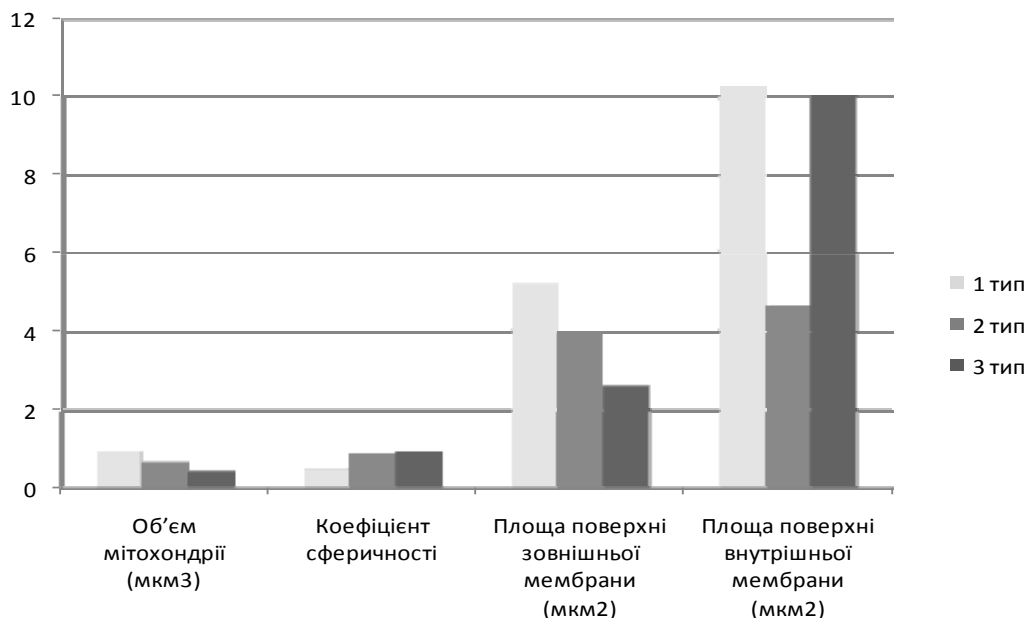


Рис. 1. Значення ультраструктурних параметрів трьох типів мітохондрій у складі скоротливих кардіоміоцитів зрілого серця щурів.

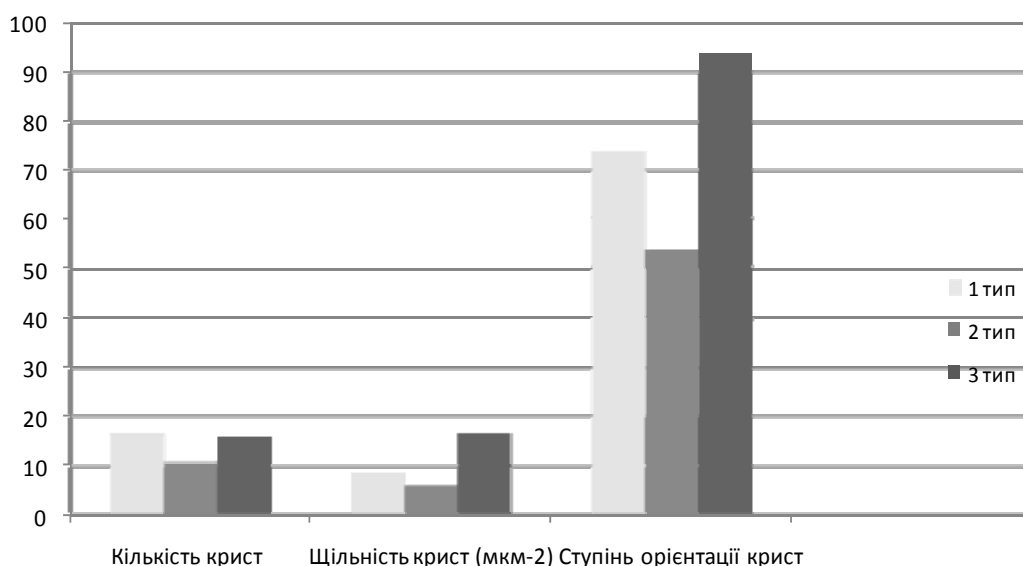


Рис. 2. Значення ультраструктурних параметрів крист трьох типів мітохондрій у складі скоротливих кардіоміоцитів зрілого серця щурів.

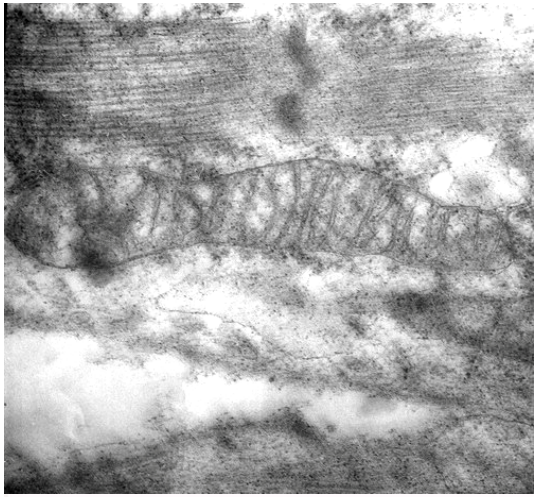


Рис. 3. Мітохондрія 1-го типу в саркоплазмі скоротливого кардіоміоцита лівого шлуночка серця щура на 20-у добу пренатального розвитку. Електронорама. $\times 30000$.

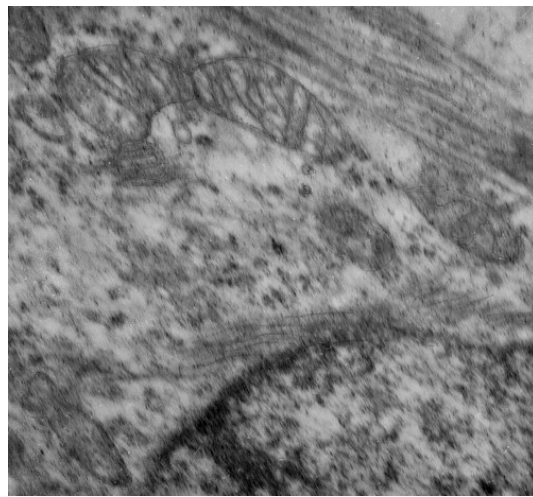


Рис. 6. «Високоенергетичні» мітохондрії в саркоплазмі скоротливого кардіоміоцита правого шлуночка серця щура на 20-у добу пренатального розвитку. Електронорама. $\times 20000$.

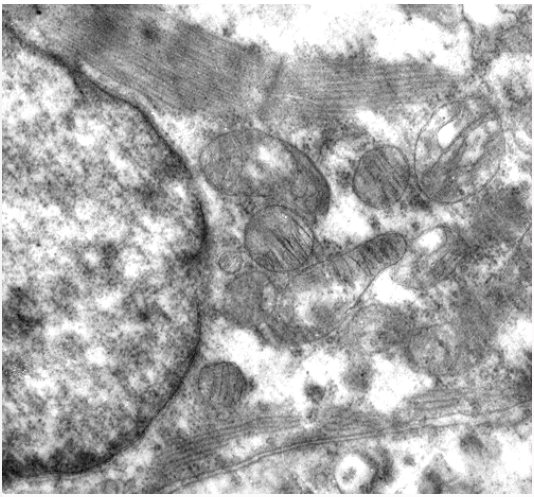


Рис. 4. Мітохондрії 2-го та 3-го типу в саркоплазмі скоротливого кардіоміоцита лівого шлуночка серця щура на 20-у добу пренатального розвитку. Електронорама. $\times 25000$.

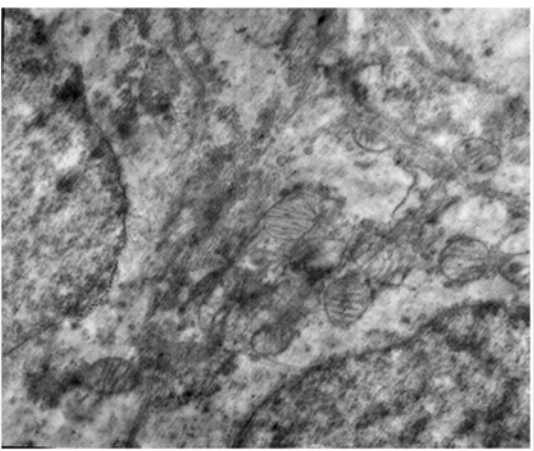


Рис. 5. «Низькоенергетичні» мітохондрії в парануклеарному просторі скоротливого кардіоміоцита правого шлуночка серця щура на 20-у добу пренатального розвитку. Електронорама. $\times 15000$.

З'ясування механізму формування гетерогенності мітохондріального апарату в онтогенетичному аспекті показало, що співвідношення усіх типів мітохондрій на етапах онтогенезу щурів є неоднаковим та суттєво відрізняється від характеристик скоротливих кардіоміоцитів новонароджених (рис. 7).

Аналіз статистичного розподілу інтегральних параметрів мітохондрій вказує на відносну однорідність мітохондрій скоротливих кардіоміоцитів на етапах раннього пренатального онтогенезу. На 12-ту добу ембріогенезу щурів мітохондрії за своїми ультраструктурними параметрами наближаються до органел 2-го типу: невеликі органели кулястої форми, які містять відносно прозорий матрикс, помірно розвинені та мають слабо орієнтовані кристи. При цьому більша їх частка представлена мітохондріями, що формуються. На 14-ту добу пренатального онтогенезу щурів крім мітохондрій 2-го типу виявляються органели, що розташовуються поряд з новоутвореними міофібрилами. За своєю структурною організацією вони відповідають органелам 1-го типу: відносно великі за розмірами, видовженої форми, з добре розвинутими кристами та помірно щільним матриксом. Проте загальна кількість органел цього типу не перевищує 7% від загального числа усіх мітохондрій. Мітохондрії 3-го типу зустрічаються в поодиноких випадках. Протягом 16-21-ї діб пренатального розвитку щурів кількість «високоенергетичних мітохондрій» закономірно зростає, що, безумовно, пов'язано зі збільшенням функціонального навантаження на серцевий м'яз, диференціюванням міофібрилярного апарату скоротливих кардіоміоцитів та к періоду новонародженості значно превалює (рис. 7).

Встановлено, що в різних відділах серця рівень неоднорідності мітохондрій має відмінності як за кількісним співвідношенням органел різних

типів, так і за сумарною щільністю упаковки

мітохондрій в саркоплазмі (рис 8, 9).

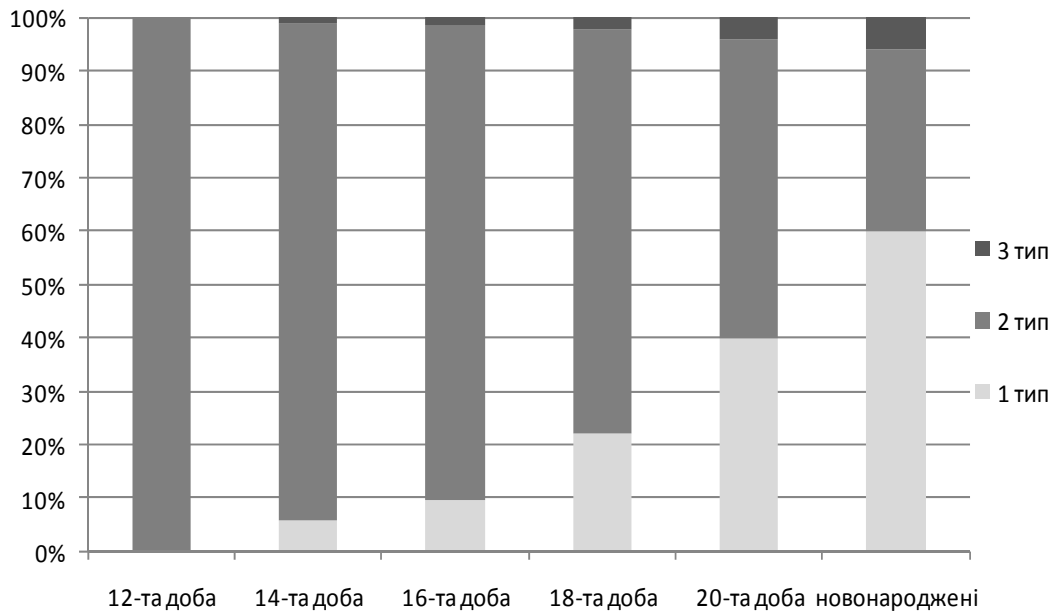


Рис. 7. Динаміка кількісного співвідношення типів мітохондрій (% від загальної кількості) в міокарді лівого шлуночка на етапах кардіогенезу щурів.

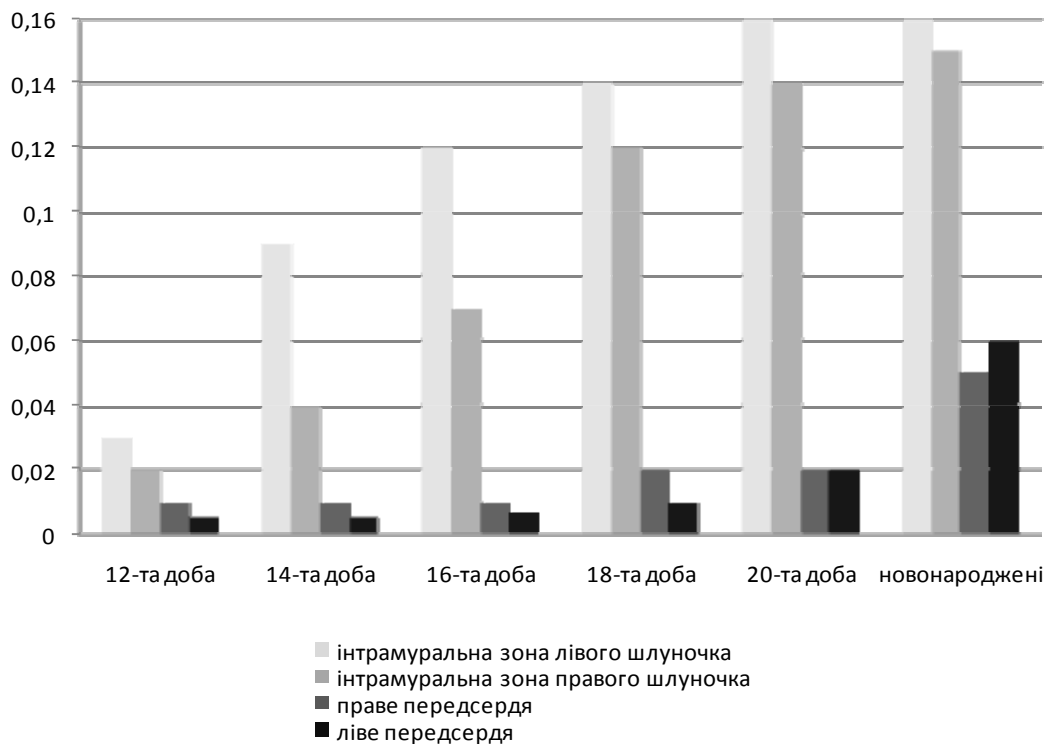


Рис. 8. Динаміка щільності упаковки мітохондрій ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$) в кардіоміоцитах різних відділів серця на етапах пренатального кардіогенезу щурів.

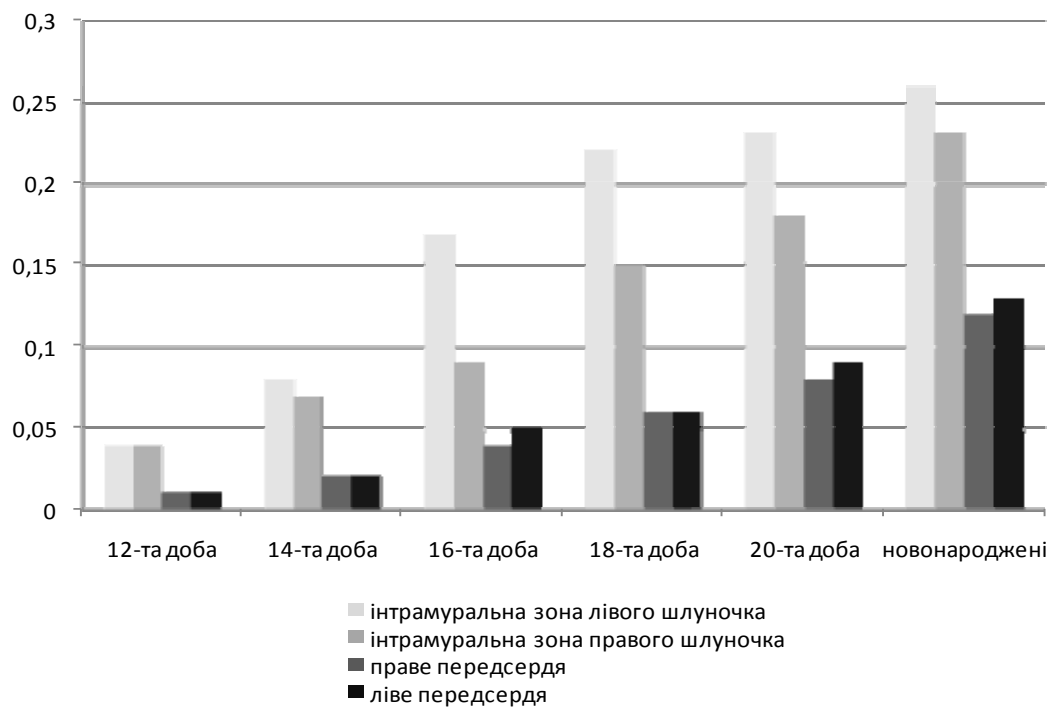


Рис. 9. Динаміка інтегрального параметра гетерогенності мітохондрій в кардіоміоцитах різних відділів серця на етапах пренатального кардіогенезу щурів.

На початкових етапах ембріогенезу щурів темпи зростання щільності упакування мітохондрій більш активні в лівому шлуночку в порівнянні з показниками правого шлуночка, але ці зміни обумовлені накопиченням «низькоенергетичних» органел. У даний період ступінь гетерогенності мітохондріального апарату як шлуночкового, так і передсердного міокарда статистично вагомо не відрізнялась. В подальшому зростання показників щільності упакування мітохондрій відбувається за рахунок збільшення частки мітохондрій 1-го типу («високоенергетичних»), що обумовлює збільшення параметра гетерогенності мітохондрій, особливо у лівому шлуночку. В міокарді передсердь динаміка формування мітохондріального апарату значно відрізняється від такої у шлуночках. Зокрема, на початкових етапах кардіогенезу накопичення мітохондрій у саркоплазмі скоротливих кардіоміоцитів передсердь дуже повільне, а ступінь гетерогенності мітохондріального апарату на всьому етапі пренатального онтогенезу значно поступається відповідним показникам шлуночків. Мітохондрії 1-го типу зустрічаються поряд з міофібрилами в поодиноких випадках не тільки на ранніх етапах

кардіогенезу, але на пізніх, до періоду новонародженості, значна популяція мітохондрій представлена органелами «низько енергетичними», 2-го типу, серед них вагома частка представлена мітохондріями, що формуються, зі світлим матриксом та слабо розвинутими кристами.

Підсумок

Функціонування мітохондріального апарату кардіоміоцитів ґрунтується на принципах гетерогенності органел. Протягом пренатального розвитку серця щурів відбувається закономірне збільшення ступеня гетерогенності мітохондріального апарату, причому формування та ступінь його розвитку неоднакові в різних відділах серця. Найбільш активні темпи формування мітохондріоми відбуваються в міокарді лівого та правого шлуночків та на етапах раннього кардіогенезу реалізуються за рахунок «низькоенергетичних» органел, а в подальшому – завдяки значному збільшенню частки «високоенергетичних» мітохондрій.

Перспективи подальших розробок пов'язані з аналізом реакцій мітохондріального апарату скоротливих кардіоміоцитів щурів на хронічну та гостру гіпоксію.

Літературні джерела

Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. Руководство. – М. : Медицина, 1990. – 384 с.
 Бакеева Л. Е. Ультраструктура митохондрий в условиях эндогенного окислительного стресса,

защитное действие митохондриального антиоксиданта SkQ1 / Л. Е. Бакеева, В. Б. Сапрунова, Д. И. Пилипенко // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новоси-

бирск, 2008. – С. 329.

Мутафьян О. А. Врожденные пороки сердца у детей / О. А. Мутафьян. – СПб, 2002. – 210 с.

Нуджент Э. В. Врожденные пороки сердца / Э. В. Нуджент // Клиническая кардиология. – СПб. : Невский диалект, 2000. – С. 259-286.

Объекты биологии развития [ред. Астауров Б. Л.]. – М. : Наука, 1975. – 572 с.

Розвиток серця / В. О. Козлов, М. А. Машталір, Г. В. Довгаль [та ін.] // 36. стат. міжнар. конф. «Самміт нормальних анатомів України та Росії». – Тернопіль : Укрмедкнига, 2003. – С. 58-61.

Сапрунова В. Б. Ультраструктура митохондриального аппарата кардиомиоцитов при апоптозе, индуцированном продолжительной аноксией у крыс // В. Б. Сапрунова, Л. Е. Бакеева, Л. С. Ягужинский // Цитология. – 2003. – Vol. 45, № 11. – P. 1073-1082.

Солодовникова И. М. Морфофункциональные характеристики митохондрий кардиомиоцитов изолированных кусочков миокарда при инкубации в условиях гипоксии : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.25-03 «Гистология, цитология, клеточная биология» / И. М. Солодовникова. – М. , 2007. – 22 с.

Сударикова Ю. В. Ультраструктура митохондриального ретикула кардиомиоцитов человека при алкогольной кардиомиопатии / Ю. В. Сударикова, Л. Е. Бакеева, В. Г. Ципленкова // Биохимия. – 1997. – Vol. 62, № 9. – P. 989-1002.

Твердохлеб И. В. Гетерогенность миокарда и ее развитие в нормальном кардиоогенезе / И. В. Твердохлеб. – Днепропетровск: Пороги, 1996. – 224 с.

Bereiter-Hahn J. Structural implications of mitochondrial dynamics / J. Bereiter-Hahn, M. Vöth, S. Mai, M. Jendrach // Biotechnol. J. – 2008. – Vol. 3, № 6. – P. 765-780.

Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis / D. Linde, E. E. Konings, M. A. Slager [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2011. – Vol. 58, № 21. – P. 2241-2247.

Cadenas S. Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease / S. Cadenas, J. Aragonés, M. O. Landa-zuri // Cardiovasc. Res. – 2010. – Vol. 88. – P. 219-228.

Distefano G. Molecular pathogenesis of myocardial remodeling and new potential therapeutic targets in chronic heart failure / G. Distefano, P. Sciacca // Ital. J. Pediatr. – 2012. – Vol. 38, № 1. – P. 41.

Early prenatal diagnosis of major cardiac anomalies in a high-risk population / G. C. Comas, A. Galindo, J. M. Martinez [et al.] // Prenat. Diagn. – 2002. – Vol. 22, №7. – P. 586-593.

Kuo J. Electron microscopy: methods and protocols / J. Kuo. – Totowa, New Jersey : Humana Press Inc., 2007. – 608 p.

Rapid cooling preserves the ischaemic myocardium against mitochondrial damage and left ventricular dysfunction / R. Tissier, N. Couvreur, B. Ghaleh [et al.] // Cardiovascular Research. – 2009. – Vol. 83. – P. 345-353.

Sharland G. Fetal cardiac screening and variation in prenatal detection rates of congenital heart disease: why bother with screening at all? / G. Sharland // Future Cardiol. – 2012. – Vol. 8, № 2. – P. 189-202.

Иванченко М.В., Твердохлеб И.В. Ультраструктурная характеристика митохондрий кардиомиоцитов в раннем кардиоогенезе крыс.

Резюме. Проведено ультраструктурное исследование митохондрий миокарда эмбрионов крыс на разных этапах пренатального онтогенеза. Показано, что в составе саркоплазмы сократительных кардиомиоцитов определяется значительный их полиморфизм, соотношение всех типов митохондрий на этапах онтогенеза крыс неодинаковое и существенно отличается от данных сократительных кардиомиоцитов новорождённых. Установлено, что распределение митохондрий разных типов отличается специфической локализацией в клетке, что обусловлено функциональными особенностями этих органелл. На протяжении пренатального развития сердца крыс происходит закономерное увеличение степени гетерогенности митохондриального аппарата. При этом, формирование и степень его развития по отношению к отделам сердца не одинаковое. Наиболее активные темпы развития митохондрия происходят в миокарде левого и правого желудочков, наиболее низкие – в предсердном. На этапах раннего кардиоогенеза они реализуются за счёт «низкоэнергетических» органелл, в дальнейшем – благодаря значительному увеличению доли «высокоэнергетических» митохондрий.

Ключевые слова: миокард, ультраструктура митохондрий, кардиоогенез, крысы.