

М.В.Іванченко

ДЗ «Дніпропетровська
медична академія МОЗ
України»

Ключові слова: шури,
міокард, кардіогенез,
ультраструктура міто-
хондрій, гіпоксія.

Надійшла: 30.08.2013

Прийнята: 05.10.2013

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2013.3.43-48>

УДК 611.127:611.018:611.013

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ПЕРЕБУДОВИ МІТОХОНДРІЙ У СКЛАДІ СКОРОТЛИВИХ КАРДІОМІОЦИТІВ ШЛУНОЧКІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ПРЕНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

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)

Реферат. Мета – ультраструктурне дослідження перебудов мітохондрій міокарда шлуночків ембріонів щурів на різних етапах пренатального онтогенезу за умов впливу хронічної внутрішньоутробної гіпоксії. В якості об'єкта дослідження були використані білі безпородні шури. Внутрішньоутробна гіпоксія моделювалась шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції нітриту натрію на 10 та 21 день вагітності. Ембріональні серця щурів на 14-й, 16-й, 18-й, 20-й добі пренатального онтогенезу досліджували за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії. Розраховували щільність упакування та чисельну щільність мітохондрій. Структура окремих мітохондрій та мітохондріального ретикулула в цілому значно змінювалась. Гетерогенність органел і їх локалізація в клітині обумовлює специфічну відповідь мітохондрій на патологічний процес. На етапах раннього кардіогенезу морфологічні та ультраструктурні перебудови мітохондріального апарату більш значні в правому шлуночку скоротливих кардіоміоцитів серця щурів у порівнянні з параметрами лівого шлуночка та по відношенню до внутрішньоклітинної локалізації активніше виявляються в субсарколемальній та міжміофібрилярних зонах клітини і обумовлені зниженням показників мітохондріального росту і розвитку гетерогенності органел. За умов пренатальної гіпоксії найбільш значні зміни розвиваються в мітохондріях субсарколемальної та міжміофібрилярної зон кардіоміоцитів лівого шлуночка серця шура.

Morphologia. – 2013. – Т. VII, № 3. – С. 43-48.

© М.В.Іванченко, 2013

✉ docmarinka@gmail.com

Ivanchenko M.V. Ultrastructural changes of mitochondrion in the contractile ventricular cardiomyocytes of rats under experimental conditions of chronic prenatal hypoxia.

ABSTRACT. Background. Ultrastructure of mitochondria depends on the functional load on the organelle and is characterized by dynamic changes in the outer, and particularly the inner mitochondrial membrane, cristae and cause changes in the intensity of ATP synthesis and normal contractile function of the heart. **Objective.** Analysis of the ultrastructural rearrangement of mitochondria in the rat ventricular contractile cardiomyocytes at the prenatal ontogenesis in conditions of chronic intrauterine hypoxia. **Methods.** White rats were used as a material. Intrauterine hypoxia was modeled by intraperitoneal injection of sodium nitrite on the 10th and 21st day of pregnancy. Embryonic hearts on the 14th, 16th, 18th and 20th days of prenatal ontogenesis were investigated with the help of transmission electron microscopy. Packaging and quantitative density of mitochondria were estimated. **Results.** It was shown that during prenatal ontogenesis the structure of individual mitochondria and mitochondrial network significantly changes. Heterogeneity of the organelles and their localization in the cell reflects a specific response of mitochondria on the pathological process. On early stages of rat embryogenesis morphological and ultrastructural changes in mitochondrial network are more prominent in the contractile cardiomyocytes of the right ventricle comparing with the parameters of the left ventricle. In the same manner changes in the subsarcolemmal and intermyofibrillar regions are more significant than in the intracellular localized mitochondria and result in decrease of mitochondrial growth parameters and development of heterogeneity of organelles. **Conclusion.** Under the hypoxic conditions during rat prenatal ontogenesis the most significant processes of mitochondria destruction takes place in the subsarcolemmal and intermyofibrillar regions of cardiomyocytes of left ventricle.

Key words: rats, myocardium, cardiogenesis, mitochondrial ultrastructure, hypoxia.

Citation:

Ivanchenko MV. [Ultrastructural changes of mitochondrion in the contractile ventricular cardiomyocytes of rats under experimental conditions of chronic prenatal hypoxia]. *Morphologia*. 2013; 7(3):43-8. Ukrainian.

Вступ

Електронномікроскопічні дослідження скоротливих кардіоміоцитів (Кмц) дорослих щурів показали, що об'ємна частка мітохондріального апарата складає 30-35% [1]. З огляду на те, що мітохондрії є органелами, які утилізують кисень у клітині, їх регулююча відповідь на зміну його доставки відіграє важливу роль у загальній функціональній адаптації до гіпоксії. Добре відомо, що мітохондрії – надзвичайно пластичні органели, які активно змінюють свою форму. Ультраструктура мітохондрій зрілої клітини залежить від функціонального навантаження на органелу і характеризується динамічними змінами зовнішньої й особливо внутрішньої мітохондріальних мембран, ультраструктури крист і, як наслідок, зміни інтенсивності синтезу АТФ та реалізації нормальної скоротливої функції серця. Всередині клітини мітохондрії утворюють взаємопов'язану, збалансовану цілісну систему та постійно проходять етапи злиття та поділу [2], порушення яких призводить до виникнення серцевих розладів [3]. Окрім своєї фундаментальної ролі в енергетичному метаболізмі вони виконують багато інших важливих функцій, проте механізми їх реалізації є недостатньо з'ясованими та можуть бути пов'язані з властивостями системного рівня.

Мітохондрії в межах Кмц вирізняються значним поліморфізмом та різноманітними біохімічними властивостями і здатні по-різному взаємодіяти з іншими внутрішньоклітинними структурами [4]. Важливим і досі не вирішеним залишається питання взаємозв'язку неоднорідності функцій і регіональної спеціалізації мітохондрій, шляхи реалізації гетерогенітету в клітині і ступінь їх залежності від патологічного стану [5]. Останні досягнення в області методів вивчення органел в онтогенетичному аспекті за нормальних умов та при розвитку міокарда під впливом різних ушкоджень також показали, що саме мітохондрії є одним з найбільш чутливих компонентів клітини, реакції яких визначають перебіг адаптаційних і альтеративних процесів [6]. Хоча індуковані гіпоксією зміни формування мітохондріального апарата в клітині були зареєстровані [7], на сьогодні динаміка морфогенетичних перебудов мітохондріоми ембріонального серця за умов хронічного гіпоксичного ушкодження залишається недостатньо дослідженою.

Мета даного дослідження полягає в аналізі особливостей ультраструктурних перебудов мітохондрій у складі скоротливих Кмц шлуночків щурів на етапі пренатального онтогенезу за умов впливу хронічної внутрішньоутробної гіпоксії.

Матеріали та методи

Дослідження виконані на білих безпородних щурах-самках та їх потомстві. Маса дорослих щурів коливалась від 200 г до 330 г. В якості матеріалу для даного дослідження були використані серця ембріонів на різних етапах пренатально-

го онтогенезу. Хронічну пренатальну гіпоксію моделювали на вагітних самках шляхом внутрішньоочеревинного введення 1%-вого нітриту натрію від 10-ї до 21-ї доби вагітності в дозі 5 мг/100 г ваги – дозі, що викликає гіпоксію середнього ступеня тяжкості [8]. Контрольним тваринам вводили внутрішньоочеревинно 1 мл 0,9%-вого фізіологічного розчину натрію хлориду. Тварини знаходились у стандартних умовах утримання, режимі та раціоні харчування.

Ембріональний матеріал експериментальних тварин отримували в лабораторних умовах відповідно до рекомендацій Ю.М.Кожем'якіна зі співавторами (2002) [9]. Дослідження проведені у відповідності до законодавства України (закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15.12 2009 року № 1759-VI), правил Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях, а також Концепції ІФТ АМН України щодо роботи з лабораторними тваринами.

Отримані зразки різних ділянок міокарда протягом 3-4 годин фіксували при +2°C в 2,5%-вому розчині глутаральдегіду, виготовленому на 0,2М фосфатному буфері (рН 7,4). Подальша фіксація проводилась в 1%-вому забуференому (рН 7,4) розчині OsO₄ («SPI», США) протягом 1 години. Зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації та в пропіленоксиді. Для виготовлення епоксидних блоків використовували Epon 812 («SPI», США). 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 75-80 кВ і первинних збільшеннях від 2000 до 80000 за стандартною схемою. Ділянки препарату вивчались за оригінальною запатентованою методикою (пат. 83611) та були зафіксовані на монохромну плівку Agfa з подальшим відцифруванням зображень TIFF формату сканером Canon CanoScan 900F.

Проведення кількісного дослідження міокарда виконували за допомогою програмного пакету ImageJ 1,47v (розробка ініційована автором Wayne Rasband в Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Maryland, USA та поширюється без ліцензійних обмежень як суспільне надбання), використовуючи загальні принципи стереометричного аналізу, викладені Г.Г.Автанділовим (1990) [10].

Кількісну оцінку ультраструктурних змін проводили через підрахунок щільності упаковки і чисельної щільності мітохондрій. Морфометричні дані зазнавали статистичної оброб-

ки. Визначення вірогідності розходжень між вибірками проводили з урахуванням 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

Ультраструктурний аналіз скоротливих Кмц шлуночків показав, що протягом пренатального онтогенезу серця структура окремих мітохондрій та мітохондріального ретикулума в цілому значно змінювалась.

На 12-у добу ембріогенезу щура темпи збільшення щільності упакування мітохондрій обумовлені активним накопиченням новоутворених органел. Мітохондрії як експериментальної так і групи контролю були представлені невеликими кулястими органелами зі слабо орієнтованими кристами везикулярної форми, що пенетрують вглиб прозорого матрикса. З подальшим розвитком Кмц (на 14-у добу гестації) внутрішня мітохондріальна мембрана утворювала кристи глобулярної форми, місцями більш зрілі кристи тубуло-ламелярної та ламелярної структури. Мітохондрії ставали більш витягнуті, іноді розгалужувалися та в поодиноких випадках утворювали між собою контакти. Матрикс деяких мітохондрій набував значної електронної щільності, що пов'язано, на нашу думку, збільшенням активності органел. Відмінностей у динаміці збільшення щільності упакування мітохондрій губчастого, компактного, трабекулярного міокарда не спостерігалось. Однак вже на 14-ту добу серед мітохондрій скоротливих Кмц, що розвивались за умов гіпоксичного ушкодження, зустрічались органели з ознаками деградації або явищами гіперфункції (рис. 1). Спостерігали набряк мітохондрій, часткову деструкцію крист, вимивання

матрикса, плямисте просвітлення, іноді в ньому утворювались ділянки так званих «порожнеч».

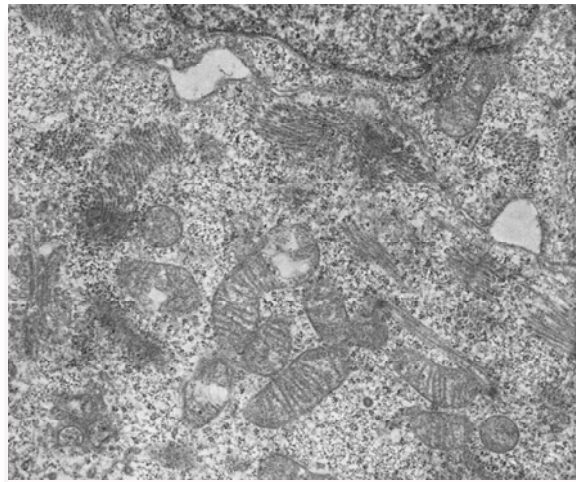


Рис. 1. Міокард щура експериментальної групи на 14-у добу пренатального розвитку. Набряк мітохондрій, плямисте просвітлення матрикса. Електроннограма. $\times 12000$.

Починаючи від 16-ї доби пренатального онтогенезу в скоротливих Кмц міокарда шлуночків аналіз мітохондріома показав затримку темпів мітохондріального росту і розвитку гетерогенності органел, що супроводжувалось відставанням від контрольних показників чисельної щільності та щільності упакування мітохондрій (рис. 2, 3). З'ясування механізму формування гетерогенітету мітохондріального апарату в онтогенетичному аспекті показало, що мітохондрії парануклеарної, міжміофібрилярної та субсарколемальної зон клітини функціонально і структурно неоднорідні, що відображається на реакціях мітохондрій, які розвиваються за гіпоксичних умов.

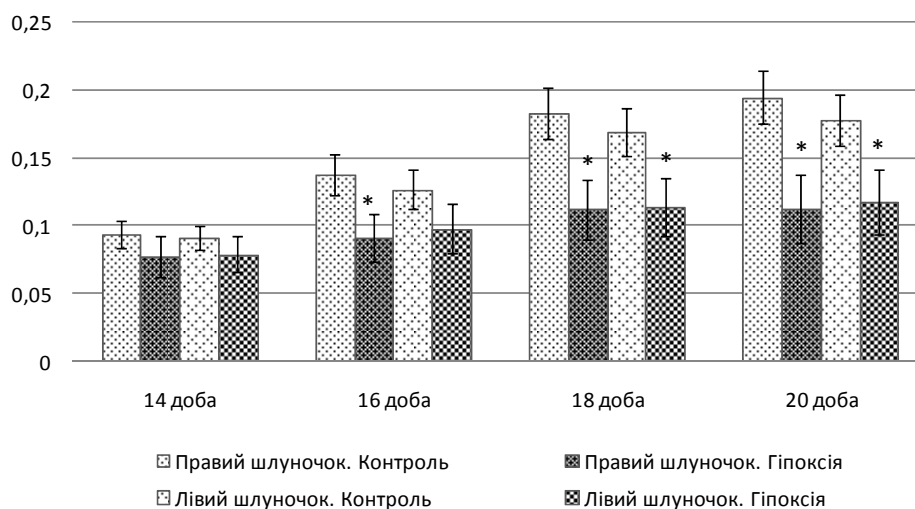


Рис. 2. Динаміка змін щільності упакування мітохондрій у саркоплазмі скоротливих Кмц інтрамуральної зони правого та лівого шлуночків ($\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$) на етапах пренатального онтогенезу. Позначки «*» вказують на достовірну відмінність від групи контролю ($p < 0,05$).

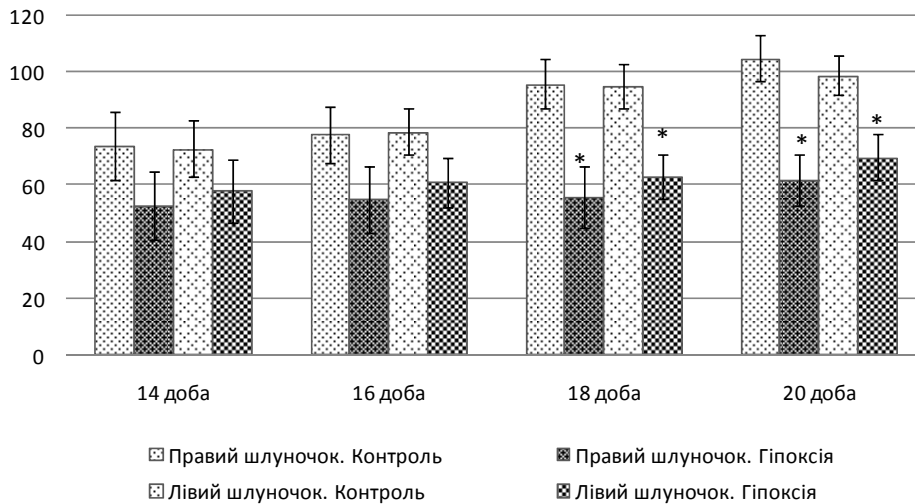


Рис. 3. Динаміка змін чисельної щільності мітохондрій у саркоплазмі скоротливих Кмц інтрамуральної зони правого та лівого шлуночків ($\times 10^2 \mu\text{m}^{-3}$) на етапах пренатального онтогенезу. Позначки «*» вказують на достовірну відмінність від групи контролю ($p < 0,05$).

У субсарколемальній зоні серед невеликих органел кулястої чи витягнутої форми з прозорим матриксом визначались набряклі мітохондрії зі зруйнованими кристами та зонами вимивання матрикса. В зовнішній мембрані деяких з них спостерігали тріщини та розриви (рис. 4). Щільність упакування, чисельна щільність були нижчими за відповідні дані нормального міокарда.

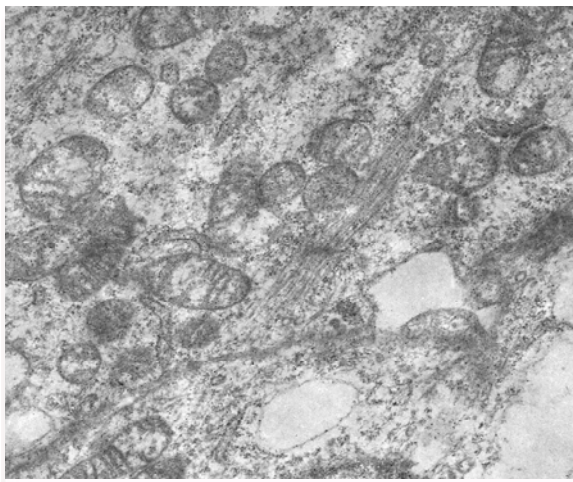


Рис. 4. Міокард щура експериментальної групи на 16-у добу пренатального розвитку. Набряк мітохондрій субсарколемальної зони, руйнація крист, місцями тріщини та розриви зовнішньої мембрани, вимивання, плямисте просвітлення матрикса. Електроннограма. $\times 15000$.

При дослідженні мітохондрій парануклеарної локалізації Кмц виявлялись змінені та зовсім не змінені органели. Поодинокі зустрічались мітохондрії з помірним набряком та просвітленням матрикса (рис. 5).

У міжміофібрилярній зоні основна популяція органел була представлена відносно велики-

ми за розмірами, видовженої форми, з добре розвинутими кристами та помірно щільним матриксом мітохондріями (рис. 6).



Рис. 5. Міокард щура експериментальної групи на 18-у добу пренатального розвитку. Мітохондрії парануклеарної зони. Електроннограма. $\times 15000$.

Аналіз мітохондрію експериментальної групи в порівнянні з групою контролю показав, що в цій зоні скоротливого Кмц збільшувалась частка органел, які мають кулясту форму, невеликі за розмірами та площею зовнішньої мітохондріальної мембрани в порівнянні з основною популяцією мітохондрій.

Важливо відзначити, що в даних органелах площа поверхні внутрішньої мітохондріальної мембрани, кількість та щільність крист значно перевищували аналогічні показники інших мітохондрій, які за ультраструктурною будовою відповідають описаним раніше «високоенергетичним» мітохондріям конденсованої конфігурації [11].

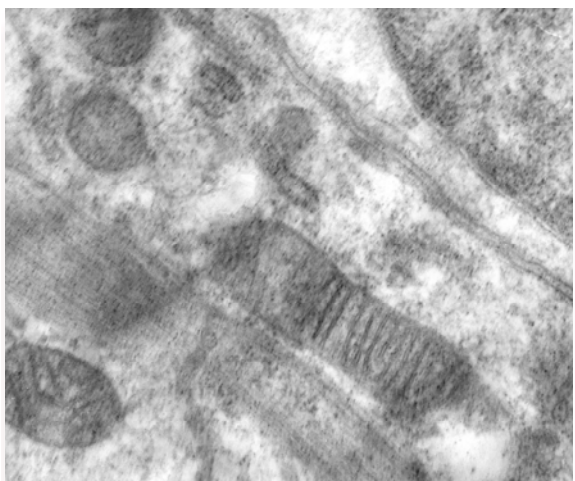


Рис. 6. Міокард щура експериментальної групи на 20-у добу пренатального розвитку. Мітохондрії міжміофібрилярної зони. Електроннограма. $\times 15000$.

У пізньому фетальному періоді кардіогенезу щура за умов гіпоксичного ушкодження продов-

жувалися прогресуючі процеси затримки диференціювання мітохондріального апарата та ушкодження його ультраструктури, які більш виразні у правому шлуночку в порівнянні з лівим відділом та по відношенню до внутрішньоклітинної локалізації активніше виявляються в субсарколемальній та міжміофібрилярних зонах клітини.

Підсумок

Гетерогенність органел і їх локалізація в клітині обумовлює специфічну відповідь мітохондрій на гіпоксію. На етапах раннього ембріогенезу морфофункціональні та ультраструктурні зміни мітохондріального апарата більш значні в правому шлуночку скоротливих Кмц серця щурів у порівнянні з параметрами лівого шлуночка і обумовлені зниженням показників мітохондріального росту і розвитку гетерогенності органел.

Перспективи подальших розробок пов'язані з аналізом реакцій мітохондріального апарата скоротливих Кмц передсердь щурів на хронічну гіпоксію в пренатальному періоді розвитку.

Літературні джерела References

1. The permeability transition pore controls cardiac mitochondrial maturation and myocyte differentiation / J. R. Hom, R. A. Quintanilla, D. L. Hoffman [et al.] // *Dev. Cell.* – 2011. – Vol. 21, № 3. – P. 469-478.
Hom JR, Quintanilla RA, Hoffman DL, de Mesy Bentley KL, Molkenin JD, Sheu SS, Porter GA Jr. The permeability transition pore controls cardiac mitochondrial maturation and myocyte differentiation. *Dev Cell.* 2011 Sep 13;21(3):469-78. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.008. Cited in: PubMed; PMID: 21920313; PMCID: PMC3175092.
2. Mitochondrial network in the heart / Li Q., Zhou L. Y., Gao G. F. [et al.] // *Protein and Cell.* – 2012. – Vol. 3, № 6. – P. 410-418.
Li Q, Zhou LY, Gao GF, Jiao JQ, Li PF. Mitochondrial network in the heart. *Protein Cell.* 2012 Jun;3(6):410-8. doi: 10.1007/s13238-012-2921-9. Epub 2012 Jul 1. Cited in: PubMed; PMID: 22752872.
3. Protective role of pericardial tissue on injured myocardium in rats / X. M. Wang, L. H. Xu, G. Z. Sun [et al.] // *Zhonghua. Yi. Xue. Za. Zhi.* – 2011. – Vol. 91, № 42. – P. 3012-3015.
Wang XM, Xu LH, Sun GZ, Meng Q. [Protective role of pericardial tissue on injured myocardium in rats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2011 Nov 15;91(42):3012-5. Chinese. Cited in: PubMed; PMID: 22333031.
4. 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.
Kuznetsov AV, Margreiter R. Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *Int J Mol Sci.* 2009 April; 10(4): 1911-1929. Epub 2009 Apr 24. doi: 10.3390/ijms10041911. Cited in: PubMed; PMCID: PMC2680654.
5. Standardized bioenergetic profiling of adult mouse cardiomyocytes / R. D. Readnower, R. E. Brainard, B. G. Hill [et al.] // *Physiol. Genomics.* – 2012. – Vol. 44, № 24. – P. 1208-1213.
Readnower RD, Brainard RE, Hill BG, Jones SP. Standardized bioenergetic profiling of adult mouse cardiomyocytes. *Physiol Genomics.* 2012 Dec 18;44(24):1208-13. doi: 10.1152/physiolgenomics.00129.2012. Epub 2012 Oct 23. Cited in: PubMed; PMID: 23092951; PMCID: PMC3544486.
6. Del Vesco A. P. Production of reactive oxygen species, gene expression, and enzymatic activity in quails subjected to acute heat stress. / A. P. Del Vesco, E. Gasparino // *J. Anim. Sci.* – 2013. – Vol. 91, № 2. – P. 582-587.
Del Vesco AP, Gasparino E. Production of reactive oxygen species, gene expression, and enzymatic activity in quail subjected to acute heat stress. *J Anim Sci.* 2013 Feb;91(2):582-7. doi: 10.2527/jas.2012-5498. Epub 2012 Nov 12. Cited in: PubMed; PMID: 23148249.
7. Liu X. Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress / X. Liu, G. Hajnóczky // *Cell Death Differ.* – 2011. – Vol. 18, № 10. – P. 1561-1572.
Liu X, Hajnóczky G. Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. *Cell Death Differ.* 2011 Oct;18(10):1561-72. doi: 10.1038/cdd.2011.13. Epub 2011 Mar 4. Cited in: PubMed; PMID: 21372848; PMCID: PMC3172112.
8. Иваницкая Н. Ф. Методика получения разных стадий гемической гипоксии у крыс введением нитрита натрия / Н. Ф. Иваницкая // *Патол. физиол. и эксперим. терапия.* – 1976. – № 3. – С. 69-71.
Ivanitskaya NF. [The method of modelling different

phases of hemic hypoxia in rats by the administration of sodium nitrite]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 1976; (3): 69-71. Russian.

9. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко [та ін.]. – Київ : Авіценна, 2002. – 156 с.

Kozhemyakin YuM, Khromov OS, Filonenko MA, Sayfetdinova GA, authors. Solovyov AI, editor. *Naukovo-praktychni rekomendatsiyi z utrymannya laboratornykh tvaryn ta roboty z nymy* [Scientific and practical advice on the maintenance of laboratory animals and work with them]. Kyiv: Avitsenna; 2002. 156 p. Ukrainian.

10. Автандилов Г. Г. Медицинская морфо-

метрия. Руководство / Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 1990. – 384 с.

Avtandilov GG. *Meditsinskaya morfometriya: rukovodstvo* [Medical morphometry: guideline]. Moscow: Meditsina; 1990. 384 p. Russian.

11. Твердохлеб И. В. Гетерогенность митохондриального аппарата миокарда и механизмы ее формирования в раннем онтогенезе крыс / И. В. Твердохлеб // *Цитология и генетика*. – 1998. – Т. 32, № 2. – С. 8-12.

Tverdokhlebl IV. [Heterogeneity of myocardial mitochondrial apparatus and mechanisms of its formation in the early ontogeny of rats]. *Cytology and genetics*. 1998; 32(2):8-12. Russian.

Иванченко М.В. Ультраструктурные перестройки митохондрий в составе сократительных кардиомиоцитов желудочков крыс в условиях хронической пренатальной гипоксии в эксперименте.

РЕФЕРАТ. Цель – ультраструктурное исследование перестроек митохондрий миокарда желудочков эмбрионов крыс на разных этапах пренатального онтогенеза в условиях воздействия хронической внутриутробной гипоксии. В качестве объекта исследования были использованы белые беспородные крысы. Внутриутробная гипоксия моделировалась путем внутрибрюшинной инъекции нитрита натрия на 10 и 21 день беременности. Эмбриональные сердца крыс на 14, 16, 18, 20 сутки пренатального онтогенеза исследовали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Рассчитывали плотность упаковки и численную плотность митохондрий. Показано, что структура отдельных митохондрий и митохондриального ретикулума в целом значительно менялась. Гетерогенность органелл и их локализация в клетке обуславливает специфический ответ митохондрий на патологический процесс. На этапах раннего кардиогенеза морфофункциональные и ультраструктурные перестройки митохондриального аппарата более значительны в правом желудочке сократительных кардиомиоцитов сердца крыс по сравнению с параметрами левого желудочка и по отношению к внутриклеточной локализации активнее проявляются в субсарколеммальной и межмиофибриллярной зонах клетки, и обусловлены снижением показателей митохондриального роста и развития гетерогенности органелл. В условиях пренатальной гипоксии наиболее значительные изменения развиваются в митохондриях субсарколеммальной и межмиофибриллярной зон кардиомиоцитов левого желудочка сердца крыс.

Ключевые слова: крысы, миокард, кардиогенез, ультраструктура митохондрий, гипоксия.