

О.В.Дунаєв

Луганський державний
медичний університет

УДК 616.12:611.013.395

СТАН МІТОХОНДРІАЛЬНОГО АПАРАТА ПЕРЕДСЕРДНИХ КАРДІОМІОЦИТІВ ЩУРІВ В УМОВАХ ГОСТРОЇ ІШЕМІЇ МІОКАРДА

Ключові слова: міокард,
гостра ішемія, передсердя,
кардіоміоцити, мітохондрії.

Резюме. Мета дослідження полягає в морфологічному аналізі реакцій мітохондріального апарата передсердних скоротливих кардіоміоцитів щурів в умовах гострого ішемічного стану. Гострий коронарспазм у щурів моделювали шляхом внутрішньоочеревинного введення 1 од. вазопресину. Морфологічно вивчали стан мітохондріального апарата серця після евтаназії тварин у складі міокарда правого і лівого передсердь, правого і лівого вусок серця, а також міжпередсердної перегородки. Проводили кількісну оцінку щільності упакування мітохондрій, чисельної щільності мітохондрій, площі поверхні зовнішньої мітохондріальної мембрани, щільності мітохондріальних крист, кількості крист мітохондрії, площі поверхні внутрішньої мітохондріальної мембрани, ступеня орієнтації крист, коефіцієнта сферичності мітохондрій, об'єму мітохондрії, кількісного співвідношення типів мітохондрій. Показано, що реакція різних типів мітохондрій на розвиток гострого ішемічного стану залежить від структурно-метаболічного профілю мітохондрій у складі скорочувальних кардіоміоцитів передсердь. В умовах моделювання гострої коронарної недостатності у щурів розвивається осередкова деструкція мітохондрій з ініціацією апоптозу серцевих міоцитів у зоні ішемії, а також редукція високоенергетичних мітохондрій у складі кардіоміоцитів у всіх ділянках передсердь за рахунок підвищення їх функціональної напруженості, виснаження і декомпенсації.

Надійшла: 26.05.2007

Прийнята: 12.08.2007

Dunaev A.V. The status of mitochondrial apparatus in rat atrial contractive cardiomyocytes under the acute myocardial ischemia.

Summary. The purpose of the study was to analyze morphological reactions of mitochondrial apparatus of atrial contractive cardiomyocytes in rats on the acute myocardial ischemia. Modeling of the acute myocardial ischemia in rats was realized by daily introduction of vasopressin intraperitoneum in dosage 1 Ed of rat weight. Morphological research comprised both light and electronic microscopy of myocardium of right and left atria, right and left auricles, and also interatrial septum. Stereological estimation of several indexes was carried out: the compactness of mitochondria, numeral compactness of mitochondria, surface area of external mitochondrial membrane, compactness of mitochondrial cristae, number of mitochondrial cristae, surface area of internal mitochondrial membrane, degree of cristae orientation, coefficient of mitochondrial sphericity, volume of mitochondrium, quantitative correlation of types of mitochondria. It was shown that the reaction of different types of mitochondria on development of acute myocardial ischemia in atrial contractive cardiomyocytes depends on the structural-metabolic type of mitochondria. Under the acute myocardial ischemia the moderate diffuse reduction of mitochondrial apparatus of contractive cardiomyocytes takes place that is accompanied by the prolonged renewal of high-energy mitochondria and causes energetical limitation of contractive function of atrial myocardium.

Key words: myocardium, acute ischemia, atria, cardiomyocytes, mitochondria.

Вступ

Поліморфність мітохондрій кардіоміоцитів установлена на різних біологічних об'єктах і при різних експериментальних впливах, однак пропонувані схеми морфолого-біохімічних відповідностей у функціонуванні мітохондріального апарата значною мірою залишаються умовними. Не дивлячись на значну кількість відомостей щодо численних морфо-функціональних характеристик мітохондрій, сьогодні ми ще не можемо скласти цілісне уявлення про співвідношення між типами мітохондрій і про їх характерні зміни на тлі патологічних процесів у залежності від топологічних особливостей в різних ділянках перед-

сердь.

Багатьма дослідниками доведено тісний взаємозв'язок перебігу захворювань серцево-судинної системи зі змінами в ультраструктурі кардіоміоцитів передсердь (Seymour E.M. et al., 2003; Peters C.G. et al., 2006). Зокрема, при різних ішемічних станах за допомогою електронно-мікроскопічного дослідження та стереометричного аналізу в передсердних міоцитах встановлені численні ознаки перебудов біосинтетичних процесів, що характеризувались змінами відносного об'єму еухроматину, щільності ядерних пор, комплексу Гольджі та гранулярної ендоплазматичної сітки (Hassouna A. et al., 2006).

Особливий інтерес спеціалістів до мітохондріального апарата, що його викликали клінічні аспекти енергетичного метаболізму кардіоміоцитів (Pendl F., 1957) та кількісна оцінка ультраструктурних змін мітохондрій (Hift H., Strawitz J.G., 1958; Poche R., Moenkemeier D., 1962), триває півстоліття. Сьогодні цей інтерес не знижується. Найбільш актуальні питання, пов'язані з визначенням ролі мітохондріального апарата в модуляції клітинного функціонування і смерті в умовах з різним режимом ішемізації, проаналізовані у ряді докладних наукових оглядів (McFalls E.O. et al., 2003; Monteiro P. et al., 2003; Hanley P.J., Daut J., 2005; Маслов Л.Н. и соавт., 2006; Lisa F.D. et al., 2007).

Морфологічний аналіз мітохондріального апарата кардіоміоцитів детально проведений при моделюванні гострих і хронічних ішемічних станів (Yellon D.M. et al., 2003; Wei K. et al., 2004; Buja L.M., 2005). За сучасними уявленнями, активація мітохондріальних молекулярних факторів є основною причиною апоптотичної спрямованості кардіоміоцита. На думку К.М.Регула з співавторами (2003), мітохондрія відіграє ключову роль в прийнятті рішення про те, чи буде клітина жити, або загине після ушкоджувального сигналу.

Слід зауважити, що, за даними проведених досліджень, спектр патологічних ушкоджень мітохондрій, а також їх адаптивних, регенераторних і компенсаторних реакцій має дуже широкий діапазон, проте у більшості публікацій патоморфологічні або патофізіологічні спостереження не знаходили своєї інтерпретації з точки зору детермінованого гетерогенітету мітохондрій у складі кардіоміоцитів. Лише в поодиноких роботах дослідники звертали увагу на те, що гістофункціональні особливості мітохондрій змінювалися неоднаково в залежності від локалізації органел у саркоплазмі. Зокрема, в умовах експериментальної гострої ішемії втрата цитохрома С відбувалася з боку субсарколемальних мітохондрій, в той час як парануклеарні органели залишалися без таких змін (Qian L.P. et al., 2005).

Мета дослідження – морфологічний аналіз реакцій мітохондріального апарата передсердних скоротливих кардіоміоцитів щурів на розвиток гострого ішемічного стану.

Матеріали та методи

Гострий коронароспазм у білих безпорідних щурів проводили шляхом внутрішньоочеревинного введення 1 од. вазопресину за стандартною методикою (Горчакова Н.О. та співавт., 2001). За допомогою світлового та електронного мікроскопів вивчали стан мітохондріального апарата серця після евтаназії тварин у складі міокарда правого і лівого передсердь, правого і лівого вусок серця, а також міжпередсердної перегородки. Гістологічні зрізи завтовшки від 5 мкм до 7 мкм виготовляли з парапластових блоків після фіксації тканини в рідині Буена. Зрізи фарбували гематоксилін-еозином, залізним гематоксиліном Гей-

денгайна, а також за Маллорі-Слінченком за загально прийнятими методиками. Виготовлення ультратонких зрізів проводили на ультрамікромі УМТП-5 з блоків, залитих в епон-аралдіт. Ультраструктурне дослідження проводили за схемою, запропонованою В.Я.Карупу (1984).

За принципами стереологічного аналізу (Автандилов Г.Г., 1990) у дослідженні проводили кількісну оцінку щільності упакування мітохондрій, чисельної щільності мітохондрій, площі поверхні зовнішньої і внутрішньої мітохондріальних мембран, щільності і кількості мітохондріальних крист, ступеня орієнтації крист, коефіцієнта сферичності мітохондрій, об'єму мітохондрії, кількісного співвідношення типів мітохондрій.

Результати піддавали статистичній обробці (Лакін Г.Ф., 1990), що включала визначення достовірності відмінностей між контрольною і експериментальною групами з урахуванням критерію t Ст'юдента або за допомогою непараметричних критеріїв: X-критерію Ван-дер-Вардена і U-критерію Уїлкоксона за технікою, викладеною І.В.Твердохлібом з співавторами (1996).

Результати та їх обговорення

Вивчення стану мітохондріального апарата передсердь при моделюванні гострої коронарної недостатності (1 експериментальна група) виявило численні й різноманітні патологічні зміни на світлооптичному й ультраструктурному рівнях. Звертало на себе увагу те, що дані зміни мали чітко виразний осередковий характер, що залежало від локалізації зон ішемії. У цих зонах спостерігалися характерні патоморфологічні реакції кардіоміоцитів з численними явищами апоптотичної загибелі груп скоротливих клітин. Розташовані в ділянках ішемії кардіоміоцити, які ще зберігали загальну клітинну структуру, при ультраструктурному дослідженні виявляли виразні зміни мітохондріального апарата. Зокрема, мітохондрії всіх трьох типів мали ознаки вакуолізації матрикса, фрагментації мітохондріальних мембран, значного кристоліза (рис. 1).

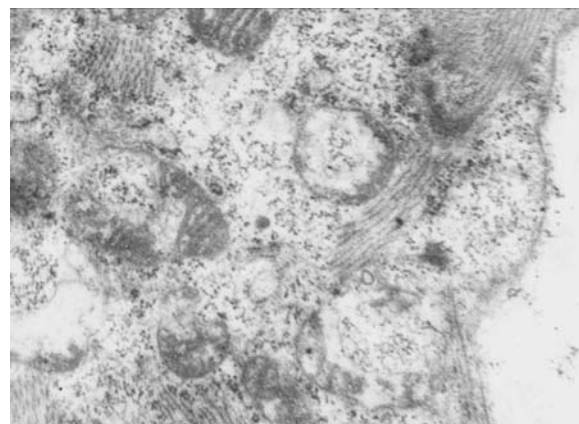


Рис. 1. Ознаки вакуолізації матрикса, фрагментації мітохондріальних мембран, значного кристоліза мітохондрій кардіоміоцита лівого передсердя щура 1 експериментальної групи в ділянці ішемії. Збільш.: ×22000.

Типовим було утворення масивних угруповань органел, що склалися із спустошених гігантських мітохондрій (рис. 2). Дані зміни, на наш погляд, свідчили про вступ клітини до апоптотичного процесу за рахунок ініціації апоптозу за мітохондріальним механізмом.

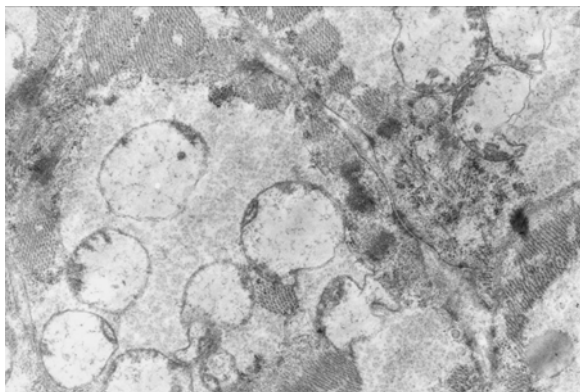


Рис. 2. Групи гігантських спустошених мітохондрій в саркоплазмі сусідніх кардіоміоцитів правого передсердя щура 1 експериментальної групи в ділянці ішемії. Збільш.: $\times 14000$.

За рахунок суттєвої деструкції втрачалася можливість ідентифікувати мітохондрії за приналежністю до певного типу, але треба відзначити, що найбільшого ішемічного ушкодження зазнавали міжміофібрилярні мітохондрії. Враховуючи, що в зазначеній внутрішньоклітинній локалізації переважають високоенергетичні органели, можна заключити, що саме вони є найбільш уразливими при моделюванні гострого ішемічного стану.

Слід зауважити, що у ділянках передсердь, віддалених від зон ішемії, на світлооптичному рівні спостерігалася збережена тканинна структура скоротливого міокарда. Апоптотичні явища не були характерними для цих ділянок, проте за допомогою електронної мікроскопії ми спостерігали ряд ультраструктурних змін у складі мітохондріального апарата (рис. 3, 4).

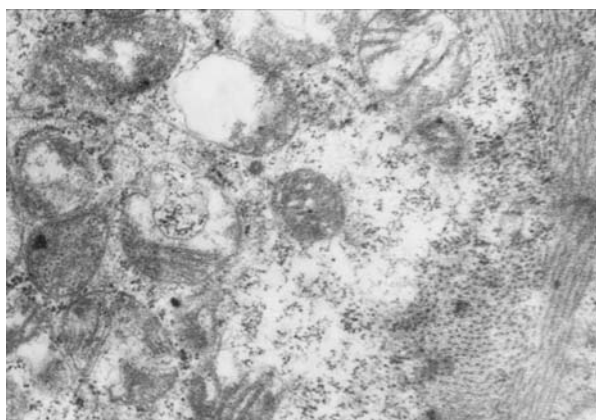


Рис. 3. Характер ушкодження міжміофібрилярних мітохондрій у саркоплазмі кардіоміоцита міжпередсердної перегородки щура 1 експериментальної групи в ділянці, віддаленій від зони ішемії. Збільш.: $\times 20000$.

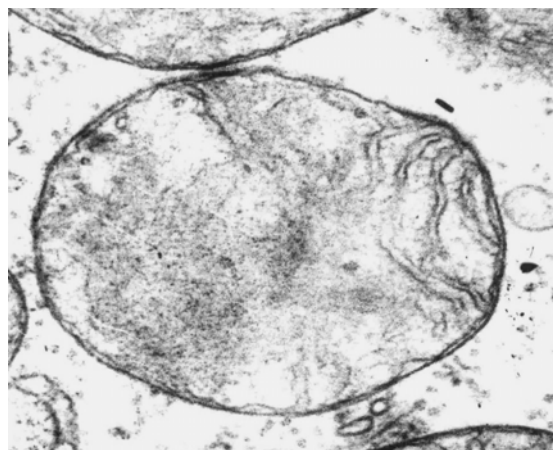


Рис. 4. Кристалізація у складі міжміофібрилярних мітохондрій у саркоплазмі кардіоміоцита лівого вухка щура 1 експериментальної групи в ділянці, віддаленій від зони ішемії. Збільш.: $\times 25000$.

Зокрема, щільність упакування мітохондрій різко, але нерівномірно знижувалась у всіх вивчених ділянках передсердного міокарда (рис. 5): у правому передсерді – на 36,4%, у лівому передсерді – на 41,7%; у правому вушку – на 53,8%, у лівому вушку – на 25,0%, у міжпередсердній перегородці – на 60,0%. Всі наведені зміни виявилися статистично вагомими.

Важливою характеристикою зазначених змін стало вивчення питання про те, за рахунок яких саме мітохондрій відбувалося зниження вмісту органел у складі скоротливих міоцитів. Морфометричні дослідження показали, що у всіх вивчених ділянках передсердь відбувалася статистично достовірна редукція мітохондрій 1 типу: у правому передсерді – на 33,9%, у лівому передсерді – на 40,0%; у правому вушку – на 44,8%, у лівому вушку – на 34,9%, у міжпередсердній перегородці – на 42,5%. За рахунок цього частка низькоенергетичних мітохондрій суттєво перевищувала контрольні значення (рис. 6).

При моделюванні гострого ішемічного стану спостерігалася суттєва зміна співвідношення між конденсованою (3 тип) і ортодоксальною (1 тип) конфігураціями високоенергетичних мітохондрій. Зокрема, якщо у контрольних щурів це співвідношення складало 1 до 3,3-3,8 в різних ділянках передсердь, то у тварин 1 експериментальної групи воно становило 1 до 6,3-15,1. Різке зменшення частки конденсованої конфігурації органел свідчить, на наш погляд, про надзвичайну напруженість у функціонуванні високоенергетичних мітохондрій, про відсутність повноцінного відновлення у фазі спокою і, як наслідок, про загрозу наступної декомпенсації. Як видно з рисунка 4.14, найбільший ступінь такої загрози виявлявся в міокарді правого вухка.

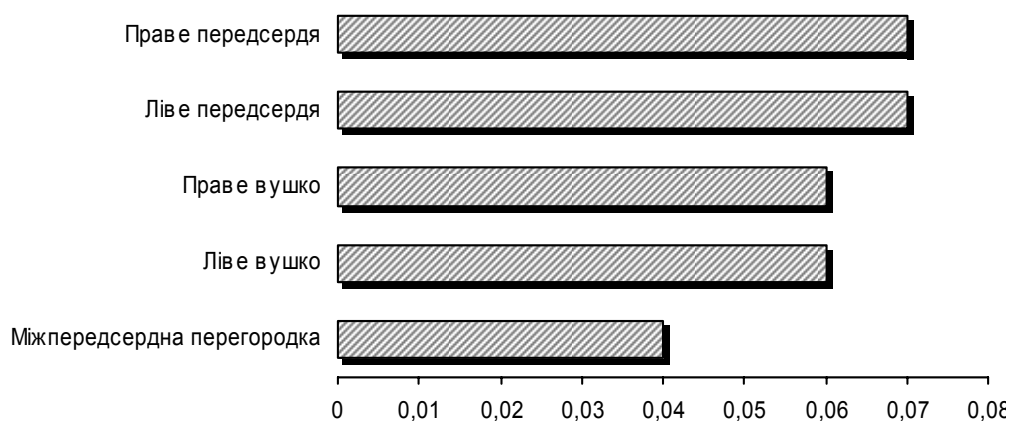


Рис. 5. Щільність упакування мітохондрій (мкм³/мкм³) у саркоплазмі скоротливих кардіоміоцитів передсердного міокарда щурів 1 експериментальної групи.

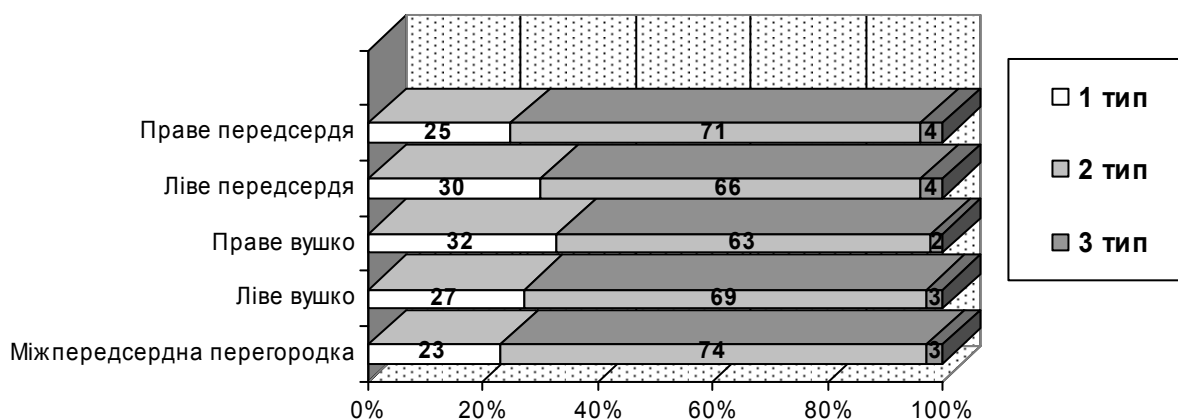


Рис. 6. Кількісне співвідношення мітохондрій 1, 2 і 3 типів (%) у саркоплазмі скоротливих кардіоміоцитів передсердного міокарда щурів 1 експериментальної групи.

Підсумок

Моделювання гострої коронарної недостатності у щурів призводить до осередкової деструкції мітохондрій з ініціацією апоптозу серцевих міоцитів у зоні ішемії, а також до редукції високоенергетичних мітохондрій у складі кардіоміоцитів у всіх ділянках передсердь за раху-

нок підвищення їх функціональної напруженості, виснаження і декомпенсації.

Перспективи подальших розробок полягають у морфологічному аналізі стану мітохондріального апарата кардіоміоцитів передсердь в умовах хронічного наркотичного отруєння.

Літературні джерела

- Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство.- М.: Медицина, 1990.- 384 с.
- Експериментальне вивчення антиангінальних, протиішемічних, кардіопротекторних засобів / Горчакова Н.О., Чекман І.С., Соловйов А.І. та ін. // Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / Під. ред. чл.-кор. АМН України О.В.Стефанова.- Вид. дім «Авіцена», 2001.- С.240-252.
- Карупу В.Я. Электронная микроскопия.- К.:

Вища школа, 1984.- 162 с.

Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов.- 4-е изд., переработанное и дополненное.- М.: Высшая школа, 1990.- 352 с.

Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Соленкова Н.В. Адаптация миокарда к ишемии. Ранняя фаза ишемического состояния // Усп. физиол. наук.- 2006.- Т.37, №3.- С.25-41.

Твердохлеб И.В., Шпонька И.С., Машталир М.А. Прикладная биометрия для морфолога.-

Днепропетровск, 1996. - 226 с.

Buja L.M. Myocardial ischemia and reperfusion injury // *Cardiovasc. Pathol.*- 2005.- Vol.14, №4.- P.170-175.

Hanley P.J., Daut J. K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms // *J. Mol. Cell. Cardiol.*- 2005.- Vol.39, №1.- P.17-50.

Hift H., Strawitz J.G. Structure and function of mitochondria in irreversible hemorrhagic shock // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*- 1958.- Vol.98, №2.- P.235-238.

HL-1 myocytes exhibit PKC and K(ATP) channel-dependent delta opioid preconditioning / Seymour E.M., Wu S.Y., Kovach M.A. et al. // *J. Surg. Res.*- 2003.- Vol.114, №2.- P.187-194.

Isoflurane preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury partly by attenuating cytochrome c release from subsarcolemmal mitochondria in isolated rat hearts / Qian L.P., Zhu S.S., Cao J.L., Zeng Y.M. // *Acta Pharmacol. Sin.*- 2005.- Vol.26, №7.- P.813-820.

Mitochondria and cardioprotection / Lisa F.D., Canton M., Menabò R. et al. // *Heart Fail. Rev.*- 2007.- Vol.22, №5.- P.367-382.

Mitochondria: role in ischemia, reperfusion and cell death / Monteiro P., Oliveira P.J., Gonçalves L., Providência L.A. // *Rev. Port. Cardiol.*- 2003.- Vol.22, №2.- P.233-254.

Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocar-

dium / Hassouna A., Loubani M., Matata B.M. et al. // *Cardiovasc. Res.*- 2006.- Vol.69, №2.- P.450-458.

Mitochondrial function: the heart of myocardial preservation / McFalls E.O., Liem D., Schoonderwoerd K. et al. // *J. Lab. Clin. Med.*- 2003.- Vol.142, №3.- P.141-148

Pendl F. Clinical aspects of myocardial energy production and utilization // *Dtsch. Med. Wochenschr.*- 1957.- №82(43).- P.1829-1832.

Peters C.G., Miller D.F., Giovannucci D.R. Identification, localization and interaction of SNARE proteins in atrial cardiac myocytes // *J. Mol. Cell Cardiol.*- 2006.- Vol.40, №3.- P.361-374.

Poche R., Moenkemeier D. Quantitative morphological studies on the mitochondria: myofibril ratio in the myocardial cells in starvation atrophy and in artificial hibernation // *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*- 1962.- Vol.335.- P.271-281.

Regula K.M., Ens K., Kirshenbaum L.A. Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill // *J. Mol. Cell. Cardiol.*- 2003.- Vol. 35, №6.- P.559-567.

Wei K., Min S., Long C. Cardioprotective effects of mitochondrial KATP channels activated at different time // *Chin. Med. J.*- 2004.- Vol.117, №5.- P.647-651.

Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology // *Physiol. Rev.*- 2003.- Vol.83, №4.- P.1113-1151.

Дунаев А.В. Состояние митохондриального аппарата предсердных кардиомиоцитов крыс в условиях острой ишемии миокарда.

Резюме. Цель исследования заключается в морфологическом анализе реакций митохондриального аппарата предсердных сократительных кардиомиоцитов крыс в условиях острого ишемического состояния. Острый коронароспазм у крыс моделировали путем внутрибрюшинного введения 1 ед. вазопрессина. Морфологически изучали состояние митохондриального аппарата сердца после эвтаназии животные в составе миокарда правого и левого предсердий, правого и левого ушек сердца, а также межпредсердной перегородки. Проводили количественную оценку плотности упаковки митохондрий, численной плотности митохондрий, площади поверхности внешней митохондриальной мембраны, плотности митохондриальных крист, количества крист митохондрии, площади поверхности внутренней митохондриальной мембраны, степени ориентации крист, коэффициента сферичности митохондрий, объема митохондрии, количественного соотношения типов митохондрий. Показано, что реакция разных типов митохондрий на развитие острого ишемического состояния зависит от структурно-метаболического профиля митохондрий в составе сократительных кардиомиоцитов предсердий. В условиях моделирования острой коронарной недостаточности у крыс развивается очаговая деструкция митохондрий с инициацией апоптоза сердечных миоцитов в зоне ишемии, а также редукция высокоэнергетических митохондрий в составе кардиомиоцитов во всех участках предсердий за счет повышения их функционального напряжения, истощения и декомпенсации.

Ключевые слова: миокард, острая ишемия, предсердия, кардиомиоциты, митохондрии.