

УДК 616–074/078:616.152.21:616.12:611–018.11:59.082

© Коллектив авторов, 2013.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ СУБСТРАТ ВТОРИЧНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ТРАНЗИТОРНОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА У КРЫСЯТ

И.В. Заднипрный*, О.С. Третьякова, Т.П. Сатаева******ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И.Георгиевского», г. Симферополь.*** Кафедра анатомии человека (зав. каф. – проф. Пикалюк В.И.);**** Кафедра социальной медицины и экономики здравоохранения (зав.каф. – проф. Третьякова О.С.);***** Кафедра биологии (зав. каф. – д.м.н. Кутя С.А.)*

MORPHOLOGICAL SUBSTRATUM OF SECONDARY MITOCHONDRIAL DYSFUNCTIONS AT TRANSITIONAL ISCHEMIA OF THE MYOCARDIUM AT INFANT RATS

I.V. Zadnipyryny, O. S. Tretiakova, T. P. Sataeva

SUMMARY

The metabolic breaking connected with mitochondrial dysfunction, are important pathogenetic aspect of cardiomyopathy development, including developing at influence perinatal hypoxia. Morphological substratum of secondary mitochondria dysfunctions at transitional myocardium ischemia is establishment of development of mitochondria's damage on latic and vacuolar types, integrity of their membranes shown in the form of breaking, destruction of crists, and also change of their endocellular disposition (subsarcolemmal agglomerations). Development of mitochondrial dysfunction at perinatal hypoxia dictates to myocardium necessity timely and adequate it correction that causes search of the most effective energy save drugs.

МОРФОЛОГІЧНИЙ СУБСТРАТ ВТОРИННОЇ МИТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ ПРИ ТРАНЗИТОРНІЙ ІШЕМІЇ МІОКАРДУ У ЩУРЯТ

I.V. Задніпрний, О.С. Третьякова, Т.П. Сатаєва

РЕЗЮМЕ

В статті обговорюється питання вторинної мітохондріальної дисфункції, що розвивається при транзиторній ішемії міокарду, змодельованій у новонароджених щурів, з позиції її морфологічних проявів. В ході проведеного дослідження з'ясовано, що морфологічним субстратом вторинної мітохондріальної дисфункції при транзиторній ішемії міокарду є розвиток порушень мітохондрій кардіоміоцитів за літичним і вакуолярним типами, що проявляється у вигляді порушень цілісності їх мембран, руйнування крист, а також зміна їх внутрішньоклітинної дислокації, що потребує необхідність проведення своєчасної та адекватної її корекції шляхом застосування найбільш ефективних енерготропних засобів.

Ключевые слова: гипоксия, транзиторная ишемия миокарда, вторичная митохондриальная дисфункция, эксперимент.

В современной медицине все более значимое положение занимает учение о полисистемных нарушениях клеточного энергообмена, зачастую называемых «болезнями клеточной энергетики», «митохондриальной патологией», «митохондриальной недостаточностью», а также «митохондриальной дисфункцией» [7,8,10]. Наиболее корректным на сегодняшний день является обобщенное понятие «митохондриальная дисфункция» [3].

Понятие «митохондриальная дисфункция» впервые было применено в России для объяснения нарушений синтеза энергии в клетке при разных патологических состояниях, которые в свою очередь отражают подавление активности ферментов митохондриальной дыхательной цепи на различных ее участках и сопровождаются широким спектром функционально-метаболических нарушений различных систем организма, в том числе и сердечно-сосудистой системы [4]. Изучение указанных нарушений имеет особое значение для практической медицины в связи с необходимостью их эффектив-

ной терапевтической коррекции. При этом следует понимать, что спектр патологических нарушений клеточного энергообмена чрезвычайно многообразен (повреждения различных звеньев цикла Кребса, дыхательной цепи, бета-окисления и др.).

Митохондриальная дисфункция в настоящее время рассматривается как типовой патологический процесс, развивающийся при различной патологии, вызванной многочисленными патогенными факторами, в том числе генетическими, биохимическими и структурно-функциональными дефектами митохондрий с нарушением клеточно-тканевого дыхания [9, 18]. Она не имеет этиологической и нозологической специфики, поэтому зачастую умеренные нарушения клеточной энергетики могут не проявляться в виде самостоятельного заболевания, однако нередко существенно влияют на течение других болезней. В настоящее время доказано, что большое количество болезней в качестве важных звеньев патогенеза включает в себя нарушения клеточно-

го энергообмена — вторичные митохондриальные дисфункции [7,8].

Выделяют два вида митохондриальной дисфункции — первичную как следствие врожденного генетического дефекта и вторичную, возникающую под действием различных факторов: гипоксии, ишемии, оксидативного и нитрозирующего стресса, экспрессии провоспалительных цитокинов [3,7,15–18].

Митохондриальная дисфункция может быть причиной развития не только полиорганной патологии, но и проявляться преимущественным поражением миокарда. Так, метаболические нарушения, связанные с митохондриальной дисфункцией, являются важным патогенетическим аспектом развития кардиомиопатий. Развитие метаболических изменений при кардиомиопатиях могут быть обусловлены как первичным, так и вторичным нарушением митохондриальных функций. По мнению Сухорукова [7], стадия декомпенсации при кардиомиопатиях, сопровождаемая выраженными ишемическими изменениями в миокарде, недостаточностью кровоснабжения ПБ степени сопряжена с вторичной митохондриальной недостаточностью гипоксического генеза.

В настоящее время гипоксия рассматривается как «ишемическая недостаточность» или «гипооксобиоз», т.е. состояние, когда потребность клеток в энергии не соответствует возможности генерации ее окислительным путем [14].

По своей сущности изменения в миокарде при гипоксии обусловлены нарушением баланса между потребностью миокарда в кислороде и его доставкой [7,15]. Превалирование потребности в кислороде ведет к его недостатку в миокарде, т.е. к развитию миокардиальной гипоксии. Это, прежде всего, отражается на метаболизме кардиомиоцитов в виде нарушения функционирования энерговырабатывающих органелл клетки – митохондрий.

Нарушения клеточного метаболизма, в основе которых лежит митохондриальная недостаточность, ведут к широкому спектру клинических проявлений. Они зависят от степени вовлеченности в патологический процесс различных органов и тканей, в том числе сердечно-сосудистой системы – от умеренной (функциональные заболевания) до выраженных органических поражений коронарного русла и миокарда (гипоксическая и ишемическая кардиопатия) [7,9].

Как известно, развитие митохондриальной дисфункции приводит к нарушению обратного захвата медиаторов (катехоламинов, дофамина, серотонина); нарушению ионного транспорта, генерации и проведения импульса, а также синтеза белка *de novo*; нарушению процессов трансляции и транскрипции; активизации «паразитарных» энергопродуцирующих реакций, что приводит к существенной убыли энергетических запасов клетки [6].

В условиях гипоксии с целью защиты организма от активных форм кислорода (АФК), генерируемых митохондриями, развивается следующая цепочка событий: образовавшись в митохондриях, АФК вызывают открытие поры и, как следствие, — выход цитохрома С в цитозоль, что немедленно включает дополнительные антиоксидантные механизмы, а затем митоптоз. Если в митоптоз уходит лишь небольшая часть внутриклеточной популяции митохондрий, концентрации цитохрома С и других митохондриальных проапоптотических белков в цитозоле не достигают значений, необходимых, чтобы активировать апоптоз. Если же все больше и больше митохондрий становятся суперпродуцентами АФК и «открывают кингстоны», эти концентрации возрастают и начинается апоптоз клетки, содержащей много дефектных митохондрий. В результате происходит очистка ткани от клеток, митохондрии которых образуют слишком много АФК [6]. Т.е., можно говорить о митохондриальной дисфункции как о новом патобиохимическом механизме дегенеративных расстройств широкого спектра.

Несмотря на внедрение в последние годы новых методов профилактики и лечения, внутриутробная гипоксия плода и асфиксия новорожденного занимает второе место в структуре перинатальной заболеваемости и смертности. При этом повреждение сердечно-сосудистой системы регистрируется у 40–70% новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию [1,4,5]. Исследованиями ряда авторов [4,5,12,13] доказано, что при перинатальной гипоксии развивается транзиторная ишемия миокарда, проявляющая себя клинически и сопровождающаяся развитием вторичной митохондриальной недостаточности [10,11].

Целью исследования явилось выявление морфологического субстрата вторичной митохондриальной дисфункции миокарда при перинатальной гипоксии в экспериментальных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование выполнено на 64 новорожденных крысках линии Вистар. Гипоксия у крысят вызывалась внутриутробно, интранатально и в первые часы жизни путем применения гипобарической (высотной) модели, максимально приближенной к условиям хронической внутриутробной гипоксии плода и рекомендованной для отбора потенциальных кардиопротекторов противоишемического действия [2]. Перед забоем каждое животное подвергалось тиопенталовому наркозу, после проведения торако- и перикардотомии сердце вынималось и сразу размещалось в кардиоплегический раствор (0,9% KCl при температуре 0° С), чем достигалась остановка сердца в диастолу. Разрез сердца проводился с учетом расположения магистральных путей проводящей системы.

С целью выявления микроскопических признаков гипоксии миокарда были применены традиционные гистологические методики (окраска парафиновых срезов 8–15 мкм гематоксилин-эозином, по Ван Гизону, Ли) с дальнейшим просмотром под микроскопом NU-5. Для выявления ультраструктурных признаков повреждения сердечной мышцы в 11 случаях применялась методика ультраструктурного анализа секционного материала по стандартной методике. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB (Швеция), красили толуидиновым синим, контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом. Просмотр и фотографирование выполняли на микроскопах JEM –100 В (Япония) и JEM – 100 CX (Япония) при ускоряющем напряжении 100 W.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования сердечной мышцы новорожденных крысят свидетельствуют о развитии ее ишемии [12,13]. Непосредственно в зоне ишемии отмечались деструктивные изменения и явления отека, выявлена дистрофия сократительных кардиомиоцитов по вакуолярному, литическому и смешанному типам, фрагментация части миофибрилл рабочих и проводящих кардиомиоцитов, межфибрилярный отек, а также появление «многоядерных» клеток. Последнее может быть объяснено клеточной гибелью сократительных кардиомиоцитов с утерей ими сарколеммы. Это же относится и к структурам внеклеточного матрикса. Не исключено, что его структуры гипертрофированы в результате заместительного процесса, развившегося в результате гибели внутриклеточных структур. Проявлением этого является выявление на гистологическом срезе «многоядерной» клетки,

что на самом деле является «клеточной тенью» нескольких погибших кардиомиоцитов.

При исследовании ультраструктуры кардиомиоцитов были выявлены ультраструктурные проявления гипоксии в виде мембранолиза сарколеммы сердечных клеток, повреждения их органелл. Среди органелл значительные изменения претерпевали митохондрии, которые в условиях кислородного дефицита теряли не только фрагменты мембран, но и имели признаки разрушения крист (рис.1). Ультраструктурным признаком ишемического повреждения сердечной мышцы, свидетельством нарушения клеточной проницаемости, является также выявление липидных включений в кардиомиоцитах, вакуолизация последних.

Выполняя функцию энергетических установок сердца [9, 11], митохондрии реагируют на дефицит кислорода изменением своей внутриклеточной дислокации: наибольшее их скопление выявлялось субсарколеммально. В участках ишемии митохондрии сократительных кардиомиоцитов были представлены гетерогенными органеллами разной электронной плотности (рис. 2). Контуры их были деформированы, нередко выглядели остроугольными. Митохондриальные кристы чаще всего были лизированными, часть из них имела электронноплотные включения с неровными контурами (рис. 3).

В некоторых проводящих кардиомиоцитах (преимущественно в правом желудочке) наряду с литическими процессами в миофибрилярном и митохондриальном аппаратах, выявлялось также снижение включений гликогена, что указывает на снижение энергетических запасов в кардиомиоцитах (рис.4). Следует отметить, что подобные явления были отмечены и в переходных кардиомиоцитах, в которых помимо расширения щелевого

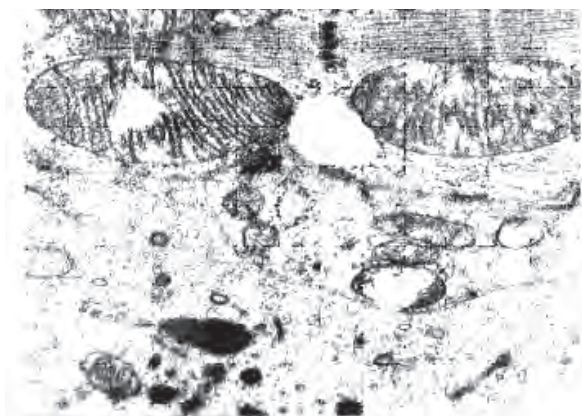


Рис. 1. Вакуолярный тип дистрофии сократительного кардиомиоцита.

Сократительный кардиомиоцит с признаками очагового повреждения. Митохондрии гетерогенные и содержат пустоты с неровными краями. Кристы митохондрий разрушены. Оболочка локально лизирована. Электроннограмма. Ув. x 25500.



Рис. 2. Вакуолярно-литический тип повреждения сократительного кардиомиоцита.

Наряду с очаговым лизисом миофибрилл сократительного кардиомиоцита наблюдаются литические процессы в гетерогенных митохондриях. Ядро содержит остроугольные инвагинаты. Электроннограмма. Ув. x 15000.

контакта вставочных дисков регистрировались значительные изменения в митохондриальном и миофибрилярном аппаратах по литическому типу (рис. 5).

В тоже время значительные нарушения в митохондриях регистрировались и среди органелл сократительных кардиомиоцитов. Они располагались в субсарколеммальном пространстве, в миоплазме вокруг ядра клеток, а также в миоплазматическом пространстве между миофибриллами, где практически не образовывали продольных столбиков. Межмиофибрилярные митохондрии в большинстве клеток располагались вблизи зоны межклеточных контактов. В некоторых кардиомиоцитах комплексы располагались субсарколеммально. Гетерогенные митохондрии

имели лизированные кристы, но чаще всего эти органеллы были разрушены полностью. Часть из них содержала электронноплотные включения (рис. 6). Выявление последних указывает на необратимый характер повреждений сократительных кардиомиоцитов, а также на повреждение их сарколеммы и мембран митохондрий. Значительные литические процессы регистрировались также в лизосомах.

ВЫВОДЫ

1. Морфологическим субстратом вторичной митохондриальной дисфункции при транзиторной ишемии миокарда является развитие нарушений митохондрий кардиомиоцитов по литическому и вакуолярному типам, проявляющиеся в виде нару-

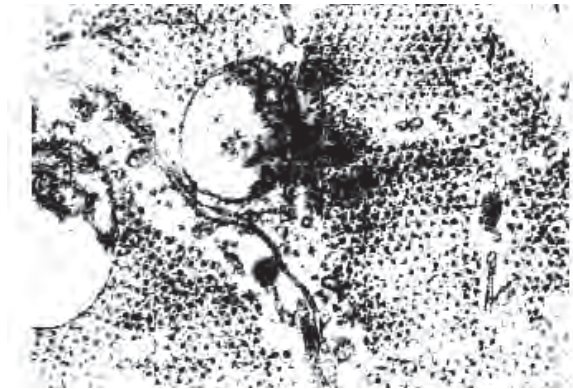


Рис. 3. Сократительный кардиомиоцит.

В сократительном кардиомиоците наряду с очаговым лизисом митохондриальных крист выявляются электронноплотные включения с неровными краями. Вставочный диск местами расширен. Электроннограмма. Ув. x 28500.

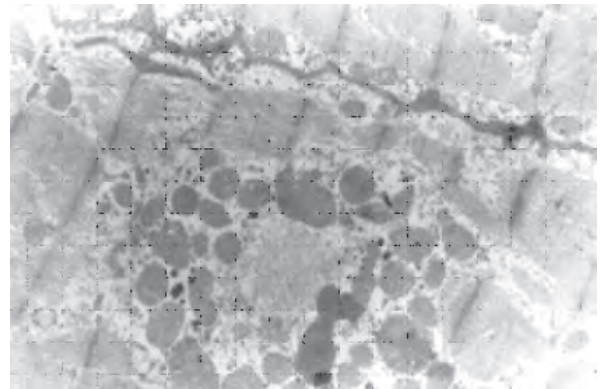


Рис. 4. Сократительный кардиомиоцит.

Очаговое распределение мелких электронноплотных митохондрий. Миофибриллы очагово разволокнены. Наблюдается снижение количества гранул гликогена. Вставочные диски локально расширены. Цистерны Т-системы частично расширены. Электроннограмма. Ув. x 11500.

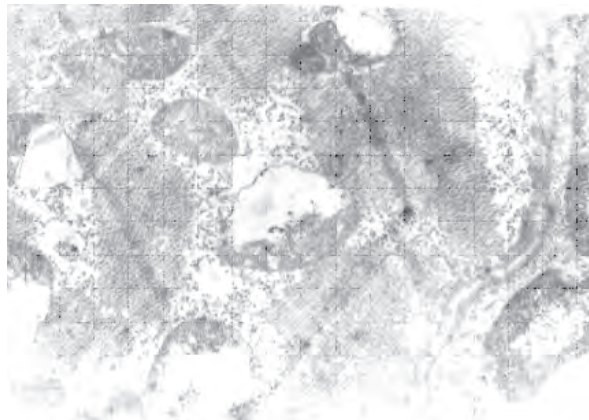


Рис. 5. Переходный кардиомиоцит.

Наблюдается не только расширение щелевых контактов вставочных дисков и снижение их электронной плотности, но и значительные изменения в митохондриальном и миофибрилярном аппаратах по литическому типу. Электроннограмма. Ув. x 15500.

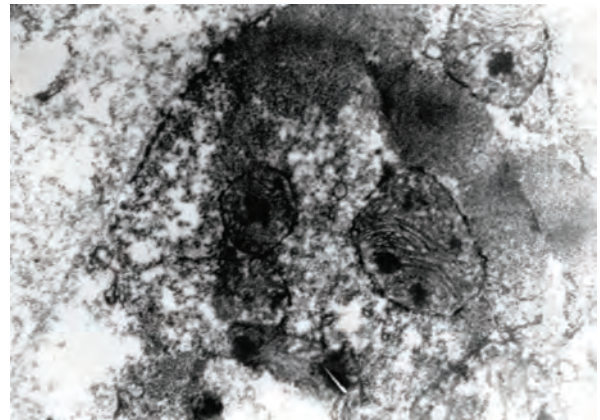


Рис. 6. Скорочувальний кардіоміоцит новонародженого щура при гіпоксії

Змішаний вакуолярно-літичний тип ушкодження мітохондрій та міофібрил. У мітохондріях містяться електроннощільні включення. Електроннограма. 3б. x 25500.

шения целостности их мембран, разрушения крист, а также изменение их внутриклеточной дислокации (субсарколеммальные скопления).

2. Развитие митохондриальной дисфункции миокарда при перинатальной гипоксии диктует необходимость своевременной и адекватной ее коррекции, что обуславливает поиск наиболее эффективных энерготропных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белозеров Ю.М. Кардиологические аспекты патологии митохондрий. Актуальные вопросы кардиологии детского возраста. М 1992;38.
2. Галенко-Ярошевский П.А., Гацура В.В. Экспериментальные аспекты оптимизации фармакотерапии острой ишемии миокарда. – М.: Медицина, 2000. – 374 с.
3. Леонтьева И.В., Сухоруков В.С., Ключников С.О. Митохондриальная дисфункция при кардиомиопатиях у детей <http://www.medvuz.com/med1808/t4/20.php>
4. Постгипоксический синдром дезадаптации сердечно-сосудистой системы у новорожденных и детей раннего возраста / Симонова Л.В., Котлукова Н.П., Ерофеева М.Е., Карпова О.Я, Гайдукова Н.В. // Педиатрия. – 2001. – №3. – С. 17–21.
5. Прахов А.В. Ишемия и инфаркты у новорожденных детей. – Н.Новгород, 1998. – 106 с.
6. Рациональная нейропротекция / Беленичев. И.Ф., Черний В.И., Колесник Ю.М. – Донецк: ИД Заславский. – 2009. – 261 с.
7. Сухоруков В.С. Нарушение клеточного энергообмена у детей// Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2002. – №5. – С.44–50.
8. Сухоруков В.С., Клембовский А.И., Невструева В.В. и др. Митохондриальная природа кардиомиопатий у детей (анализ биоптатов скелетных мышц)// Архив патологии. – 1997. – №5. – С. 8–21.
9. Сухоруков В.С. К разработке рациональных основ энерготропной терапии /Рациональная фармакотерапия. 2007. – №2. – С. 19–21.
10. Третьякова О.С., Задніпрняний І. В. Вторинна мітохондріальна недостатність кардіоміоцитів як маркер енергетичної неспроможності міокарду за умов перинатальної гіпоксії./ Перинатологія та педіатрія. – 2002. – №4. – С. 15–17.
11. Третьякова О.С. Энергетический обмен гипоксически поврежденного миокарда новорожденных / Укр. мед. часопис. – 2003. – №5(37). – С. 109–116.
12. Третьякова О.С., Задніпрняний І. В. Структурная перестройка миокарда новорожденных крыс в условиях перинатальной гипоксии./ Здоровье женщины. – 2003. – №4 (16). – С. 48–51.
13. Третьякова О.С., Задніпрняний І.В. Перинатальная гипоксия и феномен «оглушенного» миокарда новорожденных./ Современная педиатрия. 2007. – №4 (17). – С. 177–180.
14. Четвериков Д.А., Гостева С.В. и др. Значение гипотермии в изменении интенсивности обмена фосфолипидов мозга при разных формах гипоксии // Липиды в организме животных и человека. – М.: Наука, 1974. – С. 126–133.
15. Garsia Marin, J. Goldenth M. Cardiomyopathies and anomal mitochondrial function. Cardiovascular Res. – 1994. – V. 28(4). – P. 456–463.
16. Sidi D., Le Bidois J, Pechaud J. . Enzymatic activities of mitochondrial respiratory chain child with cardiomyopathies 34 case prospectively studies by endomyocardial biopsy. Arch MollCocurVais. – 1992. – V. 85. – P. 5.
17. Rustin P., Labidois J., Christien D. et.al. Endomyocardial biopsies for early detection of mitochondrial disorders in hypertrophical cardiomyopathies. J. Pediatr. – 1994. – V. 124. – P. 224–228.
18. Ozava T. Mitochondrial cardiomyopathy. Herz. – 1994. – V. 19(2). – P. 105–118.