

М. В. Іванченко

Кількісна ультраструктурна характеристика перебудов мітохондріального апарата скоротливих кардіоміоцитів шлуночків у пренатальному онтогенезі за умов хронічної гіпоксії

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Ключові слова: щури, міокард, кардіогенез, мітохондрії, гіпоксія.

Виконано кількісний ультраструктурний аналіз особливостей формування і реакцій мітохондріального апарата кардіоміоцитів щурів на етапах пренатального онтогенезу за умов хронічної внутрішньоутробної гіпоксії в експерименті. Аналіз показав, що хронічна гіпоксія призводить до затримки темпів мітохондріального росту та розвитку гетерогенності органел. Динаміка змін досліджуваних параметрів відрізняється у відділах серця та залежить від зони міокарда.

Количественная ультраструктурная характеристика перестроек митохондриального аппарата сократительных кардиомиоцитов желудочков в пренатальном онтогенезе в условиях хронической гипоксии

М. В. Иванченко

Проведен количественный ультраструктурный анализ особенностей формирования и реакций митохондриального аппарата кардиомиоцитов крыс на этапах пренатального онтогенеза в условиях хронической внутриутробной гипоксии в эксперименте. Анализ показал, что хроническая гипоксия приводит к задержке темпов митохондриального роста и развития гетерогенности органелл. Динамика измененных исследуемых параметров отличается в отделах сердца и зависит от зоны миокарда.

Ключевые слова: крысы, миокард, кардиогенез, митохондрии, гипоксия.*Патология.* – 2013. – №3 (29). – С. 66–70

Quantitative ultrastructural characteristics of the mitochondria network of ventricular muscle cells during prenatal ontogeny under the chronic hypoxia

M. V. Ivanchenko

We have studied a quantitative ultrastructural analysis of the formation and reactions of the mitochondria network in rat muscle cells during prenatal ontogeny under the chronic hypoxia in the experiment. Analysis showed that chronic hypoxia leads to delayed rate of growth and development of the mitochondria heterogeneity. Changes of the parameters are different in the heart parts and depend upon the layer of myocardium.

Key words: rats, myocardium, cardiogenesis, mitochondria, hypoxia.*Pathologia.* 2013; №3 (29): 66–70

Хронічна внутрішньоутробна гіпоксія, що зумовлена материнськими, плацентарними та плодовими факторами, призводить до виснаження резервних можливостей організму новонародженого та викликає порушення адаптаційних процесів у постнатальному періоді [1]. За даними фахової літератури, у 40–70% новонароджених виявляють ураження серцево-судинної системи внаслідок дії патологічно низького рівня кисню у пренатальному періоді [2]. Відомо, що забезпечення енергетичних потреб серця як одного з найбільш енергозалежних органів визначається функціонуванням мітохондріального апарата, насамперед, АТФ-продукуючою функцією органел. З'ясування ролі порушень мітохондрій у формуванні різноманітних пренатальних ушкоджень серця зумовило необхідність дослідження внутрішньомітохондріальних реакцій у реалізації патоморфологічних змін.

За нормальних умов пренатальний розвиток мітохондрій характеризується кількісними і якісними перебудовами органел [3], і вже до кінця ембріонального періоду на кристах мітохондрій серця активно перебігають процеси окисного фосфорилування. Протягом ембріонального періоду та до періоду новонародженості окисна

здатність органел зростає, а рівень білків дихального ланцюга переносу електронів і їхня активність збільшуються більш ніж удвічі [4]. Серце з відповідно розвиненим мітохондріальним апаратом стає підготовленим до збільшення післяпологового метаболізму. Резистентність серцевої тканини до нестачі кисню (гіпоксії) у пренатальному серці значно вища, ніж у зрілому міокарді [5]. Однак індуковані гіпоксією перебудови метаболізму мітохондрій призводять до зміни щільності упакування, кількості, розміру органел, динамічних трансформацій зовнішньої й, особливо, внутрішньої мітохондріальної мембрани, ультраструктури крист і, як наслідок, іншого рівня інтенсивності синтезу АТФ і реалізації нормальної скоротливої функції серця. Характер реакцій мітохондрій на механізми, які модулюють їх ефективність функції і можуть вплинути на чутливість міокарда до кисневого голодування в онтогенезі, потребують подальшого аналізу, тому вивчення особливостей перебудови мітохондріального апарата у комбінації із сучасними теоретичними уявленнями мітохондріології залишаються надзвичайно перспективними.

Мета роботи

Кількісний ультраструктурний аналіз особливостей формування і реакцій мітохондріального апарата кар-

діоміоцитів щурів на етапах раннього кардіогенезу за умов хронічної пренатальної гіпоксії в експерименті.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконали на білих безпородних щурах-самках і їхньому потомстві. Як матеріал використали серця ембріонів на 14, 16, 18, 20 добу пренатального онтогенезу. Хронічну пренатальну гіпоксію моделювали на вагітних самках шляхом внутрішньоочеревинного введення 1%-го нітриту натрію від 10- до 21-ї доби вагітності в дозі 5 мг/100 г ваги – дозі, що викликає гіпоксію середнього ступеня тяжкості [6]. Контрольним тваринам внутрішньоочеревинно вводили 1 мл 0,9%-го фізіологічного розчину натрію хлориду. Ембріональний матеріал експериментальних тварин отримували в лабораторних умовах відповідно до рекомендацій Ю.М. Кожем'якіна і співавт. [7].

Дослідження виконали відповідно до законодавства України (Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15.12 2009 р. № 1759-VI).

Отримані зразки різних ділянок міокарда готували до електронномікроскопічного дослідження за стандартною методикою. Дослідження виконали в лабораторії електронної мікроскопії ДЗ «ДМА МОЗ України» за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЭМ-100-01 («SELMi», Україна) при напрузі прискорення 75–80 кВ і первинних збільшеннях від 2000 до 80000.

Кількісне морфологічне дослідження міокарда виконували за допомогою програмного пакета ImageJ 1,47v (автор Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, USA), використовуючи загальні принципи стереометричного аналізу, викладені Г.Г. Автанділовим [8]. Кількісну оцінку ультраструктурних змін виконали через підрахунок щільності упакування і кількісної щільності мітохондрій, питомої площі поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій (враховуючи мембрану крист) субепікардіальної, трансмуральної, субендокардіальної зон міокарда лівого та правого шлуночків. Морфометричні дані опрацьовували статистично. Вірогідність відмінностей між вибірками визначали з урахуванням параметричного t-критерію Стьюдента, а також непараметричного критерію Вілкоксона у разі відсутності нормального розподілу.

Результати та їх обговорення

Дослідження динаміки змін щільності упакування і кількісної щільності мітохондрій скоротливих кардіоміоцитів (Кмц) за умов гіпоксичного ушкодження кардіогенезу засвідчило достовірну затримку розвитку мітохондріального апарату від 16-ї доби пренатального онтогенезу у правому шлуночку. Встановили залежність зміни параметрів від зони міокарда (рис. 1, 2).

Зокрема, для інтрамуральної зони стінки правого шлуночка в зазначений термін розвитку відзначили зменшення показника щільності упакування мітохондрій на 34,1% ($p < 0,05$), а кількісної щільності – на 29,4% ($p < 0,05$) порівнюючи із групою контролю. В субепікардіальній зоні названі показники були достовірно нижчі на 35,3% і 31,1% відповідно.

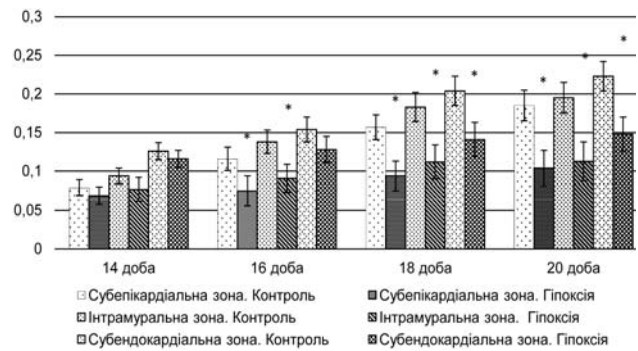


Рис. 1. Динаміка змін щільності упакування мітохондрій у саркоплазмі скоротливих Кмц правого шлуночка ($\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$) на етапах пренатального онтогенезу.

Примітка: * – достовірна відмінність від групи контролю ($p < 0,05$).

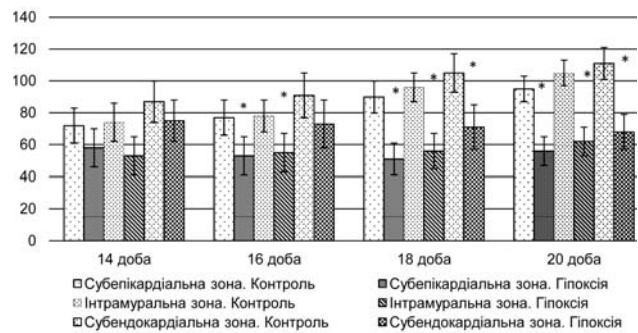


Рис. 2. Динаміка змін кількісної щільності мітохондрій у саркоплазмі скоротливих Кмц правого шлуночка ($\times 10^2 \text{мкм}^{-3}$) на етапах пренатального онтогенезу.

Примітка: * – достовірна відмінність від групи контролю ($p < 0,05$).

Період кардіогенезу щура від 18 доби за нормальних умов розвитку характеризувався активним процесом диференціювання мітохондріального апарату за рахунок збільшення функціонально активних органел і зменшення кількості несформованих мітохондрій. Це виявлялось у збільшенні показників щільності упакування та кількісної щільності мітохондрій. Темпи формування мітохондріального апарату губчастого та компактного міокарда нерівномірні й активніші в останньому. Однак в експериментальній групі від 18 доби відзначали подальше прогресуюче зниження темпів мітохондріального росту в субепікардальній та інтрамуральній зонах як правого, так і лівого шлуночків (рис. 3, 4). Щільність упакування та кількісна щільність мітохондрій субендокардіальної зони статистично не відрізнялись у лівому шлуночку, але цей параметр зберігав тенденцію до відставання.

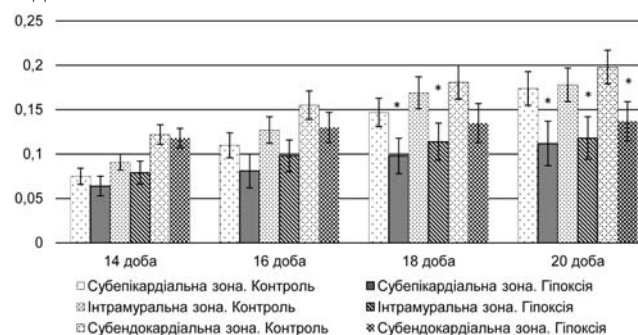


Рис. 3. Динаміка змін щільності упакування мітохондрій у саркоплазмі скоротливих Кмц лівого шлуночка ($\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$) на етапах пренатального онтогенезу.

Примітка: * – достовірна відмінність від групи контролю ($p < 0,05$).

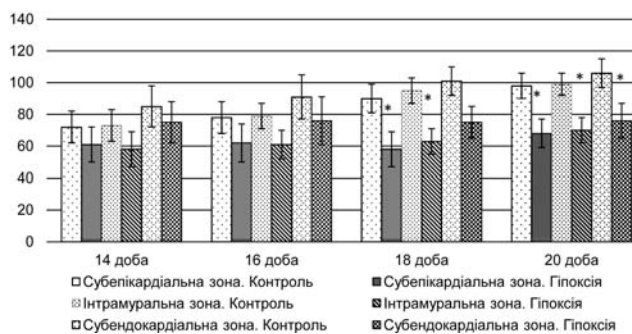


Рис. 4. Динаміка змін кількісної щільності мітохондрій у саркоплазмі скоротливих Кмц лівого шлуночка ($\times 10^2 \mu\text{м}^{-3}$) на етапах пренатального онтогенезу.

Примітка: * – достовірна відмінність від групи контролю ($p < 0,05$).

Важливо, що аналіз змін питомої площі поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій (враховуючи мембрану крист) у саркоплазмі скоротливих Кмц лівого та правого шлуночків експериментальної групи у цей період демонстрував зворотну тенденцію та достовірно зростав. Виявили достовірне переважання показника в інтрамуральній зоні лівого шлуночка на 69,6% (рис. 5). У субепікардіальній і субендокардіальній зонах збільшення питомої площі поверхні внутрішньої мембрани було менш стрімким.

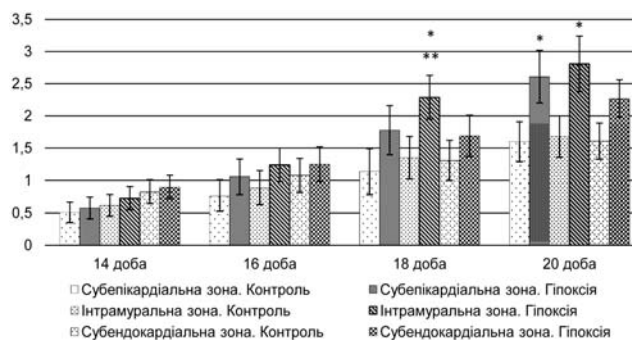


Рис. 5. Динаміка змін питомої площі поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій (враховуючи мембрану крист) у саркоплазмі скоротливих Кмц лівого шлуночка ($\mu\text{м}^2/\mu\text{м}^3$) на етапах пренатального онтогенезу.

Примітка: * – достовірна відмінність від групи контролю ($p < 0,05$); ** – достовірна відмінність у порівнянні з попереднім терміном розвитку ($p < 0,05$).

У правому шлуночку серця ембріонів щура зміни питомої площі поверхні внутрішньої мембрани були виразними і характеризувались стрімким збільшенням показників в інтрамуральній і субепікардіальній зонах (рис. 6). Переважання параметра над контрольним рівнем становило 71,6% ($p < 0,05$) і 68,1% ($p < 0,05$) відповідно. Протягом визначення темпів збільшення питомої площі поверхні внутрішньої мембрани від 16 до 18 доби розвитку виявилось, що збільшення показника в експериментальній групі правого шлуночка інтрамуральної зони становило 66,0% ($p < 0,05$), лівого – 84,7% ($p < 0,05$).

На 20 добу різницю у змінах між зонами міокарда лівого та правого шлуночків експериментальної групи не визначили. Протягом вивчення ступеня статистично вагомого відставання щільності упакування мітохондрій

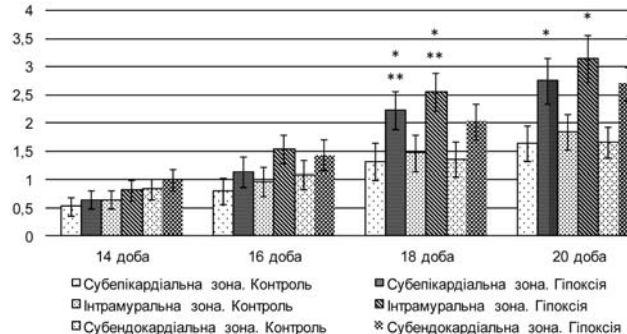


Рис. 6. Динаміка змін питомої площі поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій (враховуючи мембрану крист) у саркоплазмі скоротливих Кмц правого шлуночка ($\mu\text{м}^2/\mu\text{м}^3$) на етапах пренатального онтогенезу.

Примітка: * – достовірна відмінність від групи контролю ($p < 0,05$); ** – достовірна відмінність порівнюючи з попереднім досліджуваним терміном розвитку ($p < 0,05$).

інтрамуральної зони у правому шлуночку становило 42,1%, в лівому – 33,7%, кількісної щільності мітохондрій – 40,9% і 29,3% відповідно. Рівень параметра питомої площі поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій зростав на 71,6% для інтрамуральної зони правого шлуночка та на 67,4% для лівого.

У багатьох працях показано, що мітохондрії функціонально та структурно неоднорідні [9]. Під час ультраструктурного дослідження мітохондрію методом трансмісійної електронної мікроскопії описано мітохондрії різних популяцій за внутрішньоклітинною локалізацією: парануклеарні, міжміофібрилярні, субсарколемальні (рис. 7).

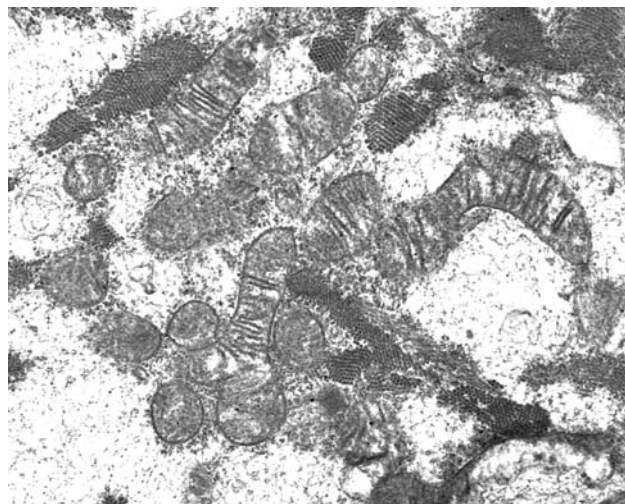


Рис. 7. Мітохондріальний апарат скоротливого Кмц правого шлуночка серця щура в нормі на 20 добу пренатального онтогенезу. Електронограма. $\times 10000$.

На нашу думку, що збігається з поглядами інших авторів [3,10], це пов'язано з морфологічною та функціональною гетерогенністю органел. Аналогічний розподіл мітохондрій за локалізацією у клітині, ґрунтуючись на особливостях функціонального профілю, визначають G.A. Porter et al. [11]. Враховуючи, що такий показник, як площа поверхні внутрішньої мітохондріальної мембрани

ни, зумовлює функціональну активність органел, дослідили характер змін питомої площі поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій за умов гіпоксичного ушкодження кардіогенезу щодо внутрішньоклітинної локалізації на 20 добу пренатального онтогенезу в інтрамуральній зоні правого та лівого шлуночків серця (табл. 1).

Таблиця 1

Питома площа поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій парануклеарної, субсарколемальної, міжміофібрилярної локалізації у саркоплазмі скоротливих Кмц лівого та правого шлуночків інтрамуральної зони міокарда на 20 добі пренатального онтогенезу (мкм²/мкм³), М ± m

Локалізація в Кмц	Група контролю		Експериментальна група	
	ЛШ	ПШ	ЛШ	ПШ
Міжміофібрилярна	2,88±0,31	3,13±0,29	5,56±0,49*	6,27±0,50*
Парануклеарна	1,26±0,29	1,37±0,30	2,16±0,41	2,31±0,39
Субсарколемальна	0,91±0,36	0,98±0,37	0,72±0,35	0,84±0,37

Примітка: * – достовірна відмінність від групи контролю (p<0,05).

Результати показали, що протягом дослідження мітохондрій міжміофібрилярної локалізації Кмц лівого шлуночка параметр достовірно перевищував такий у групі контролю на 93,1%, а в правому шлуночку збільшення його значень було суттєвішим: він удвічі переважав показники норми за рахунок збільшення частки конденсованих форм «високоенергетичних» органел (рис. 8). Параметр парануклеарної локалізації не мав статистично вагомої різниці, але зберігав аналогічну тенденцію збільшення питомої площі поверхні внутрішньої мембрани. В органелах субсарколемальної ділянки відзначили помірну статистично не вагому редукцію показника.

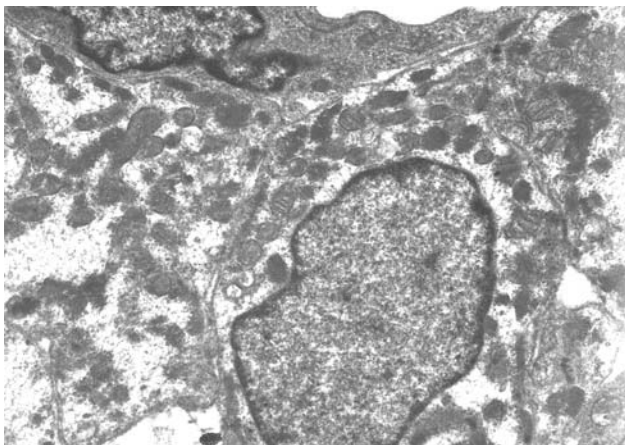


Рис. 8. Мітохондріальний апарат скоротливого Кмц інтрамуральної зони правого шлуночка серця щура експериментальної групи на 20 добу пренатального онтогенезу. Електроннограма. ×12000.

Зниження щільності упакування мітохондрій у саркоплазмі скоротливих Кмц за умов гіпоксичного ушкодження кардіогенезу може бути пов'язано з групою факторів, які зумовлюють характерну тенденцію реакцій органел. По-перше, внутрішньоутробна гіпоксія,

ймовірно, призводить до сповільнення перинатального переходу від лактату та глюкози до утилізації вільних жирних кислот як первинних джерел живлення, скорочуючи потреби в мітохондріальному рості та окисному фосфорилуванні, що може бути посилено підвищеною залежністю від гліколізу як джерела енергії в гіпоксичному міокарді. По-друге, пренатальна гіпоксія викликає суттєву затримку включення механізмів, що беруть участь у мітохондріальному рості, а дисбаланс у пластичних процесах призводить до виникнення характерних реакцій. Зворотна тенденція між змінами щільності упакування мітохондрій, кількісної щільності та показниками питомої площі поверхні внутрішньої мембрани органел, можливо, є унікальним альтернативним адаптивним механізмом у гіпоксичному серці ембріонів щура, що потребує подальшого дослідження.

Висновки

Хронічна внутрішньоутробна гіпоксія призводить до затримки темпів мітохондріального росту та розвитку гетерогенності органел скоротливих кардіоміоцитів шлуночків щурів на етапах пренатального кардіогенезу, що супроводжується достовірним відставанням щільності упакування та кількісної щільності мітохондрій від 16 доби розвитку у правому та від 18 доби в лівому шлуночку у порівнянні з показниками норми.

Динаміка змін досліджуваних параметрів відрізняється у відділах серця та залежить від зони міокарда. Суттєвіше відставання показників від норми властиве для субендокардіальної та інтрамуральної зон, меншою мірою – для субендокардіальної зони шлуночків; на 20 добу характеризуються достовірним їх зниженням по всій товщині серцевої стінки. При цьому зміни щільності упакування та кількісної щільності виразніші у правому шлуночку в порівнянні із групою контролю і становлять -42,1% (p<0,05) і -40,9% (p<0,05) в інтрамуральній зоні відповідно, менш значні в лівому – -33,7% (p<0,05) і -29,9% (p<0,05) тієї ж зони міокарда.

Під впливом гіпоксії показники питомої площі поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій, включаючи мембрану крист, демонструють зворотну тенденцію та достовірно зростають від 18 доби раннього кардіогенезу в обох шлуночках у порівнянні з нормою. Це супроводжується максимальним збільшенням показника в інтрамуральній зоні правого шлуночка від 16 до 18 доби розвитку на 66,0% (p<0,05), лівого – на 84,7% (p<0,05). На 20 добу онтогенезу перевищення показників над значеннями контрольної групи становить 67,4% (p<0,05) для лівого і 71,6% (p<0,05) для правого шлуночків, переважно за рахунок популяції конденсованих форм «високоенергетичних» мітохондрій міжміофібрилярної локалізації, показуючи альтернативний адаптивний механізм.

Перспективи подальшої роботи пов'язані з аналізом реакцій мітохондріального апарата скоротливих Кмц щурів у постнатальному періоді розвитку за умов попередньої дії хронічної внутрішньоутробної гіпоксії.

Список літератури

1. Филиппов Е.С. Задержка внутриутробного развития плода: современные аспекты проблемы / Е.С. Филиппов, Н.А. Перфильева // Сибирский мед. журнал. – 2007. – № 2 – С. 9–13.
2. Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress / D.A. Giussani, E.J. Camm, Y. Niu [et al.] // Plo. S. One. – 2012. – Vol. 7. – № 2. – P. 310–317.
3. 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.
4. Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains / J. Piquereau, M. Novotova, D. Fortin [et al.] // J Physiol. – 2010. – Vol. 588. – № 13. – P. 2443–2454.
5. Properties and functions of KATP during mouse perinatal development / L. Nie, M. Tang, Y. Zeng [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – Vol. 418. – № 1. – P. 74–80.
6. 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.
7. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко [та ін.] – К.: Авіценна, 2002. – 156 с.
8. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: [руководство] / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
9. 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.
10. Вареник Е.Н. Электронно-микроскопический анализ кардиомиоцитов левого желудочка сердца крыс в условиях моделирования эффектов невесомости и искусственной силы тяжести / Е.Н. Вареник, Т.В. Липина, М.В. Шорникова [и др.] // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2012. – № 3. – С. 270.
11. Bioenergetics, mitochondria, and cardiac myocyte differentiation / G.A. Porter, J. Hom, D. Hoffman [et al.] // Prog. Pediatr. Cardiol. – 2011. – Vol. 31. – № 2. – P. 75–81.

Відомості про автора:

Іванченко М.В., асистент каф. гістології, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»,
E-mail: docmarinka@gmail.com.

Надійшла в редакцію 11.12.2013 р.