

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИЙ КАРДИОМИОЦИТОВ ИЗОЛИРОВАННОГО МИОКАРДА КРЫСЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ИНКУБАЦИИ В УСЛОВИЯХ АНОКСИИ

© И. М. Солодовникова, В. Б. Сапрунова, Л. Е. Бакеева,¹ Л. С. Ягужинский

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;

¹ электронный адрес: bakееva@imec.msu.ru

В кардиомиоцитах изолированных кусочков миокарда, инкубированных 72 ч в условиях аноксии, возникает необычная популяция митохондрий — «митохондрии внутри митохондрий». Исследован процесс возникновения «митохондрий внутри митохондрий» в динамике. Показано, что уже через 6 ч инкубации ткани миокарда в условиях аноксии в большинстве митохондрий кардиомиоцитов наблюдается локальное увеличение отдельных участков межмембранного пространства, в которые перемещается и далее отшнуровывается участок матрикса вместе с примыкающей к нему внутренней митохондриальной мембраной. Через 12 ч инкубации ткани в условиях аноксии в этих вновь образованных структурах можно различить плотно расположенные слои мембран. Через 24 ч аноксии во вновь образованных структурах присутствуют уже четко выраженные концентрические слои мембран с заключенным между ними электронно-плотным материалом, идентичным по ультраструктуре митохондриальному матриксу. Через 72 ч аноксии в митохондриях кардиомиоцитов экспериментальной ткани образуются структуры с хорошо выраженными морфологическими признаками митохондрий, названные нами «митохондриями внутри митохондрий». Полученные результаты обсуждаются в рамках представлений о структурно-функциональных механизмах преобразования митохондриального аппарата клетки при апоптозе.

Ключевые слова: ультраструктура митохондрий, кардиомиоциты, аноксия, апоптоз.

Ранее нами (Сапрунова и др., 2002, 2003) на модели изолированных кусочков миокарда, инкубированных в условиях аноксии, было обнаружено возникновение в кардиомиоцитах особого структурного образования — «митохондрии внутри митохондрий» (рис. 1). Было показано, что после 72 ч инкубации кусочков миокарда при аноксии популяция митохондрий кардиомиоцитов гетерогенна по своей ультраструктуре: основную популяцию митохондрий кардиомиоцитов составляют органеллы с обводненным, просветленным матриксом, контрастными, хорошо выраженными мембранами, большим числом межмитохондриальных контактов нативной структуры. Кроме этого, в ткани присутствуют мелкие электронно-плотные митохондрии, которые могут располагаться как среди миофибрилл, так и внутри более крупных, электронно-прозрачных митохондрий, составляющих основную митохондриальную популяцию кардиомиоцитов. Эти преобразования митохондриального аппарата наблюдаются на фоне практически неизменной общей морфологии кардиомиоцитов — хорошо известные в литературе признаки некроза мышечной ткани (Кроленко, Рижамадзе, 1979) отсутствуют, однако в этих условиях в исследуемой ткани миокарда регистрируется межнуклеосомная фрагментация ДНК, которая является одним из маркеров апоптоза (Сапрунова и др., 2002).

Исследование функциональной активности митохондриальных фракций, изолированных из данной ткани,

показало, что функция дыхательной системы митохондрий полностью сохраняется, скорость дыхания на субстратах как первого, так и второго комплекса дыхательной цепи не снижается относительно контроля, однако фосфорилирующая функция митохондрий полностью нарушена. Добавление АДФ не стимулирует скорости дыхания (Тоньшин и др., 2003).

Популяция мелких электронно-плотных митохондрий была получена в виде отдельной фракции методом дифференциального центрифугирования (Тоньшин и др., 2003), что позволило выявить детальное строение этих структур: мелкие электронно-плотные митохондрии ограничены самостоятельной наружной мембраной, имеют незначительное число крист и электронно-плотный матрикс.

Чтобы понять, не является ли обнаруженное нами явление образования «митохондрий внутри митохондрий» артефактом условий эксперимента, а также для выяснения ультраструктурного механизма возникновения необычной митохондриальной популяции мы провели исследование состояния ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов изолированных кусочков миокарда, инкубируемых в условиях аноксии, через 6 и далее через каждые 12 ч.

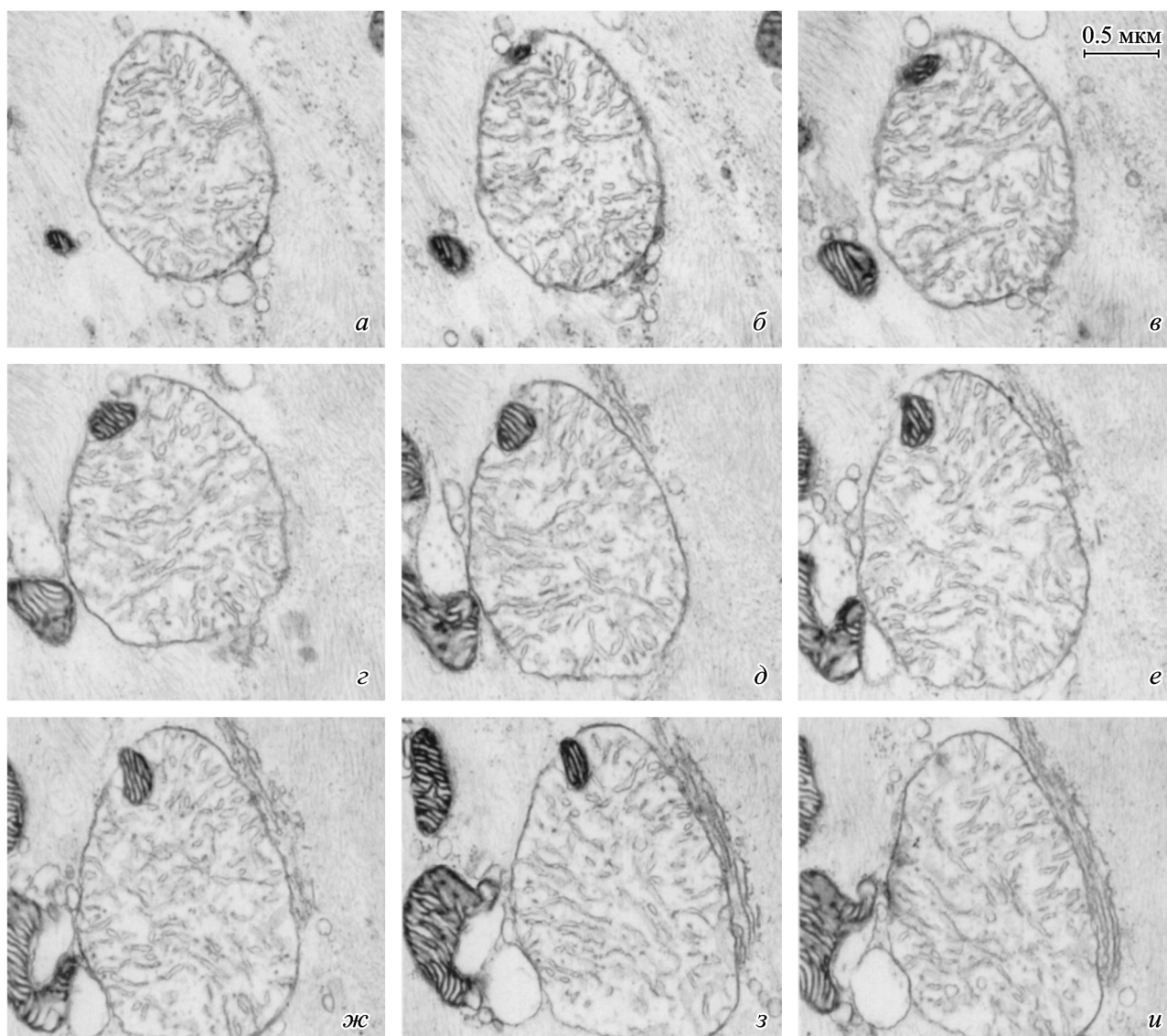


Рис. 1. Электронно-микроскопические фотографии (а—и) ультратонких серийных срезов одной из митохондрий изолированной ткани миокарда после 72 ч инкубации в условиях аноксии.

Можно видеть, что электронно-светлая митохондрия содержит в межмембранном пространстве мелкую, электронно-плотную митохондрию.

Fig. 1. Electron microscopic photographs (a—и) of serial ultrathin section of mitochondria from a cardiomyocyte of isolated cardiac tissue incubated under anoxic conditions for 72 h.

A small-sized electronic-dense mitochondrion is localized in the intracristate space of electron-light mitochondria.

Материал и методика

Тканевой препарат. Сердце декапитированных взрослых крыс массой 150—180 г извлекали, ткань желудочков быстро измельчали в буферном растворе (0.3 М сахарозы, 250 мкМ ЭДТА, 5 мМ Трис, pH 7.4) при 4 °С. Условия аноксии создавали следующим образом: при продувании образца азотом удалялось около 95 % кислорода. После герметизации образца, согласно расчетам, в течение 5—15 мин содержание кислорода снижалось за счет его потребления при дыхании до 1 мкм O₂ или ниже.

Проведение эксперимента. Изолированные кусочки кардиомиоцитов инкубировали при 20 °С в течение 72 ч. Исследование морфологии кардиомиоцитов проводили через 6, 12, 24, 36, 48, 60 и 72 ч после начала эксперимента.

Электронная микроскопия. Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали 3%-ным раствором глутаральдегида в буфере, pH 7.4, в течение 2 ч при 4 °С; затем дофиксировали 1%-ным раствором четырехокси осмия в буфере в течение 1.5 ч и обезвоживали в растворах спиртов возрастающей концентрации (70%-ный спирт был насыщен уранил-ацетатом). Материал заливали в эпоксидную смолу Эпон-812. Серийные ультратонкие срезы делали на ультрамикротоме ЛКВ-III и окрашивали свинцом по Рейнольдсу. Полученные препараты просматривали и фотографировали в электронном микроскопе HU-11B (Hitachi, Япония).

Использованные реактивы: Трис (ICN, США), ЭДТА (Serva, Германия) и сахароза (Merck, Германия).

Результаты

Исследования ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов изолированных кусочков миокарда, инкубируемых в условиях аноксии, были начаты с 6 ч инкубации ткани. На рис. 2 представлена электронно-микроскопическая фотография участка изолированного миокарда, инкубированного 6 ч в условиях аноксии. Популяция митохондрий со одинакова по своей ультраструктуре — это органеллы со сжатым, электронно-плотным матриксом и параллельно ориентированными кристами. Характерным ультраструктурным признаком митохондриальной популяции кардиомиоцитов на данное время инкубации являются необычные структурные образования внутри митохондрий (рис. 2, *стрелка*). Детально особенности внутренней организации митохондрий через 6 ч инкубации в ткани миокарда в условиях аноксии представлены на рис. 3, *а, б*. Первоначально в межмембранном пространстве митохондрий возникают незначительные по размеру (расположенные в пределах 1.5—2.0 серийных срезов) электронно-плотные замкнутые полости, диаметр которых составляет порядка 0.15 мкм (рис. 3, *стрелка*). Далее, как видно на электронно-микроскопических фотографиях (рис. 3, *а, б*), в эту полость перемещается участок матрикса, ограниченный внутренней митохондриальной мембраной (рис. 3, *б, стрелка*). Представленная на электронно-микроскопической фотографии (рис. 3, *б*) митохондрия имеет обводненный матрикс, что позволяет видеть детально организацию этой структуры внутри митохондрии. *Стрелкой* показана

но перемещение петлеобразной складки внутренней мембраны с примыкающим к ней матриксом в полость, образованную внутренней митохондриальной мембраной. Это структурное образование далее развивается в новую митохондрию.

Так, через 12 ч инкубации ткани при аноксии наблюдается увеличение этих структур внутри митохондрий и формирование их мембранного содержимого (рис. 4, *а, б*). При большом увеличении видно, что эта структура уже имеет ограничивающие мембраны (рис. 3, *б*). Также видно, что вновь образованная структура не связана с основной митохондрией, кристы митохондрии основной популяции как бы обрываются, образуя замкнутую полость, окружающую вновь образующуюся структуру.

Необходимо отметить, что в одной митохондрии может возникать несколько таких новообразований. В то же время на данный срок инкубации во все большем количестве митохондрий происходит формирование этих структурных новообразований, и в пределах одного среза можно видеть различные стадии этого процесса, т. е. процесс формирования новых структур внутри митохондрий происходит не одновременно во всех митохондриях, а постепенно затрагивает все новые органеллы.

Через 24 ч инкубации в условиях аноксии в ткани присутствует уже значительное число митохондрий, внутри которых можно наблюдать образование мелких электронно-плотных структур — предшественников митохондрий. На этом сроке инкубации ткани во вновь образованных структурах отчетливо видны концентриче-

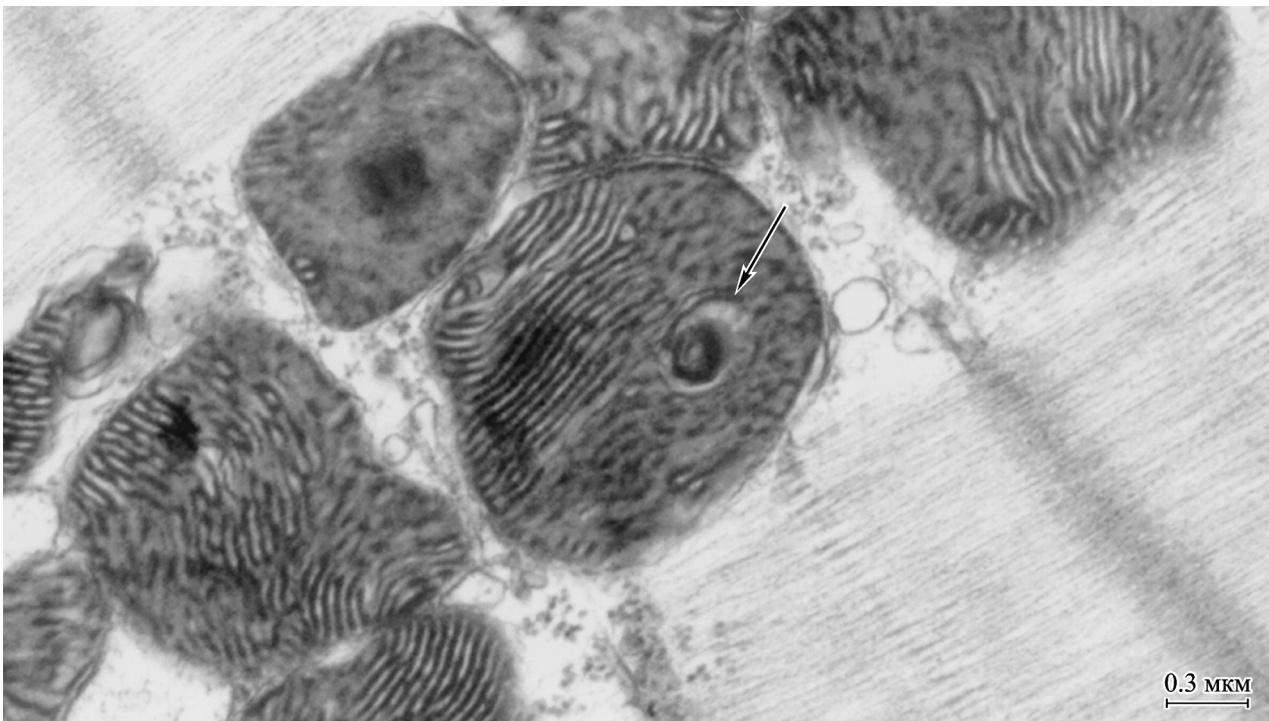


Рис. 2. Характерная картина ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов изолированной ткани миокарда, инкубированной 6 ч в условиях аноксии.

Вся популяция митохондрий имеет электронно-плотный матрикс; *стрелкой* показано возникновение в межмембранном пространстве особой структуры.

Fig. 2. Typical picture of mitochondrial ultrastructure in small pieces of cardiac tissue incubated under anoxic conditions for 6 h. All mitochondria have electron dense matrix. *Arrow* — origin of a special structure in the intermembrane space.

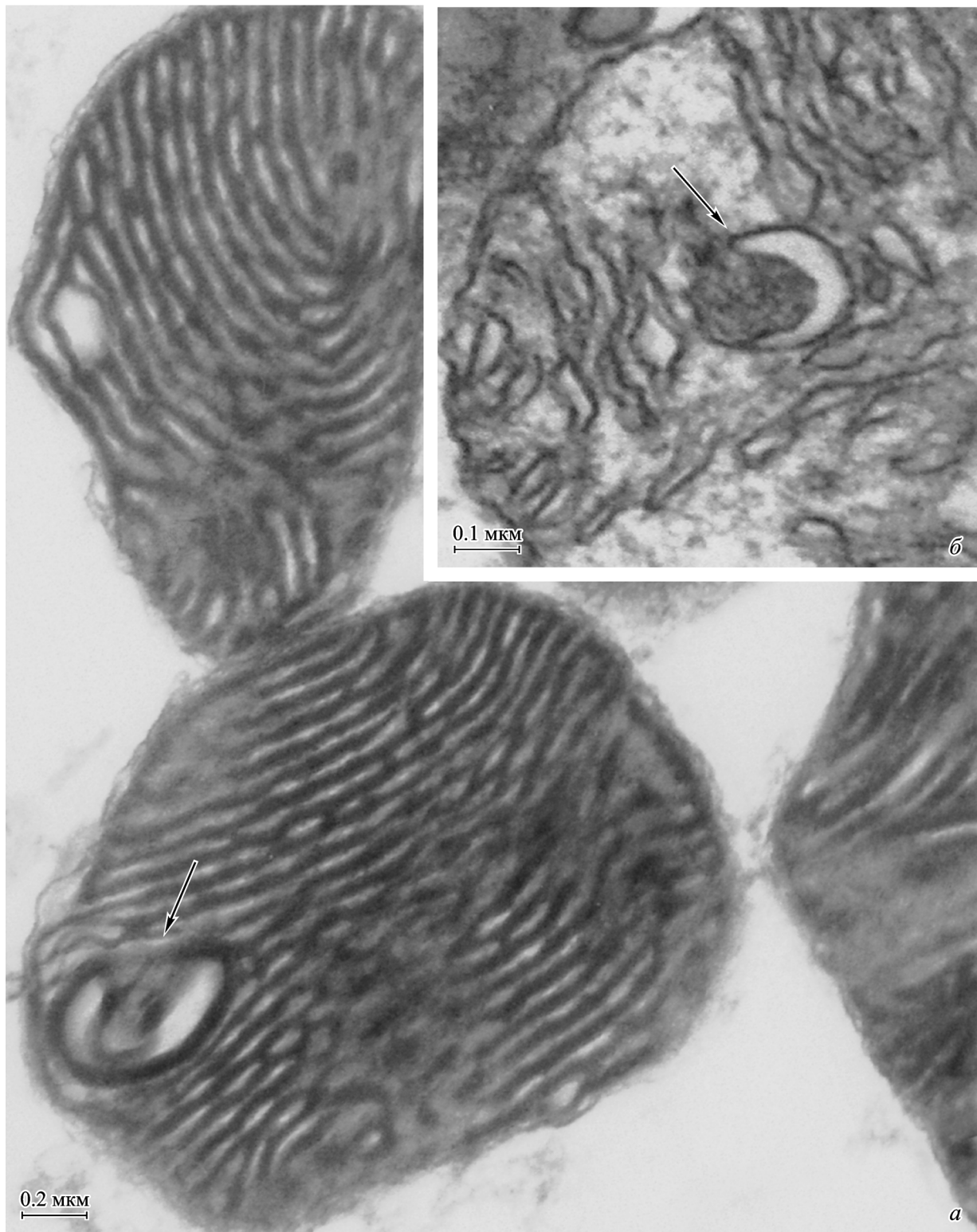


Рис. 3. Особенности ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов изолированной ткани миокарда, инкубированной 6 ч в условиях аноксии.

Стрелкой на фото *a* показано появление электронно-прозрачной полости внутри митохондрий в результате локального увеличения межмембранного пространства митохондрии; стрелкой на фото *b* показано перемещение участка матрикса, ограниченного внутренней митохондриальной мембраной, во вновь образованную полость межмембранного пространства.

Fig. 3. Ultrastructure of mitochondria of cardiomyocytes from isolated cardiac tissue incubated under anoxic conditions for 6 h. Arrow in panel *a* shows the origin of an electron light hollow inside the mitochondrion as a result of a local increase in the intermembrane space of mitochondrion. Arrow in panel *b* shows the region of matrix with adjoined inner membrane moving into this newly formed hollow of intermembrane space.

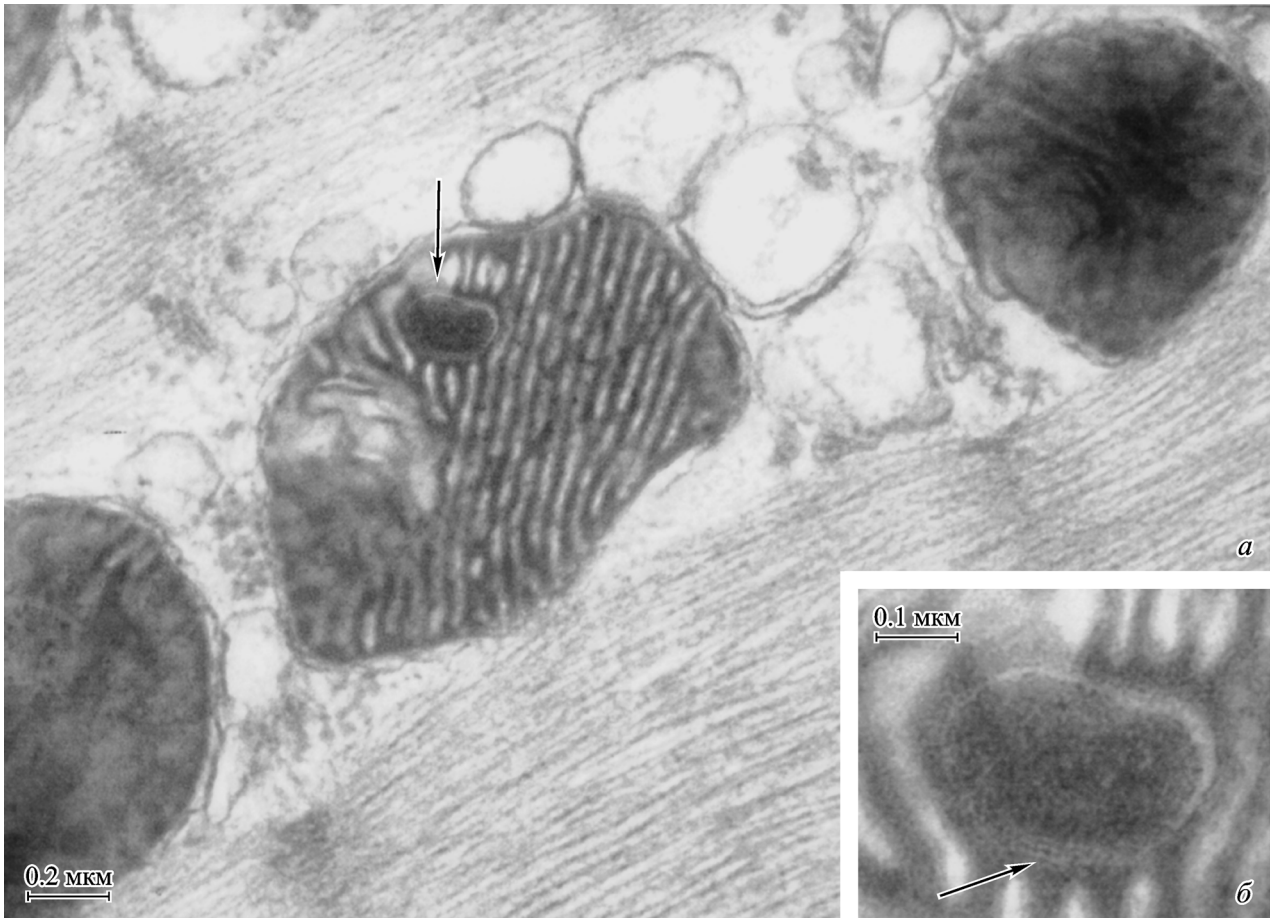


Рис. 4. Электронно-микроскопическая фотография участка кардиомиоцита изолированного кусочка ткани миокарда, инкубированного 12 ч в условиях гипоксии.

a — стрелкой показана вновь формирующаяся структура в межмембранном пространстве; *б* — участок митохондрии, показанный стрелкой на рис. 4, *a*, при большом увеличении; стрелкой показаны концентрические слои мембран.

Fig. 4. Electron microphotograph of a fragment of isolated myocardial piece incubated under anoxic conditions for 12 h.

a — arrow points the newly forming structure in the intermembrane space; *b* — the region of mitochondrion pointed by arrow on panel *a* at higher magnification; concentric layers of membrane are seen (arrow).

ские электронно-плотные мембраны с электронно-плотным матриксом между ними (рис. 5, *a*, *б*).

В дальнейшем в течение последующих 2 сут инкубации происходит увеличение размеров этих структур, формирование крист. В то же время ко 2-м сут изменяется морфологическое состояние митохондрий основной популяции, внутри которых формируется новая структура. Происходит обводнение матрикса митохондрий, митохондриальные мембраны становятся как бы лизированными. На их фоне четко видно, что во вновь образованных структурах электронная плотность мембран соответствует плотности мембран митохондрий интактного миокарда (рис. 6).

К 3-м сут инкубации в ткани присутствуют уже хорошо выраженные, соответствующие описанным нами в предыдущих работах структуры, названные нами «митохондриями внутри митохондрии» (Сапрунова и др., 2002, 2003). На рис. 1 представлены электронно-микроскопические фотографии последовательных ультратонких срезов такой митохондрии. Анализ серийных срезов показывает, что в межмембранном пространстве электронно-светлой митохондрии находится мелкая электронно-плотная митохондрия, расположенная в пределах 7 срезов.

Обсуждение

В проведенных нами экспериментах на изолированной ткани миокарда условия гипоксии, очевидно, являются сигналом к индукции процесса образования мелких электронно-плотных митохондрий. Влияние аноксии на структуру митохондриального аппарата подробно было изучено на дрожжевых клетках в рамках проблемы роли окислительного фосфорилирования в поддержании целостности митохондрий *in vivo* (Linnane et al., 1962; Мейсель и др., 1964; Wallace et al., 1968; Luzikov et al., 1971). Было показано, что переход дрожжей от аэробного роста к спиртовому брожению сопровождается деградацией митохондрий, однако в условиях аноксии никогда не наступает полного исчезновения митохондриальных структур. Описано возникновение особых митохондриальных структур — «промитохондрий». Впервые они были обнаружены Платтнером и Шатцом (Plattner, Schatz, 1969). Методом замораживания—скальвания на дрожжевых клетках *S. cerevisiae* было показано, что в условиях аноксии основная популяция митохондрий деградирует, но при этом возникает особая популяция мелких (0.2—0.8 мкм), электронно-плотных

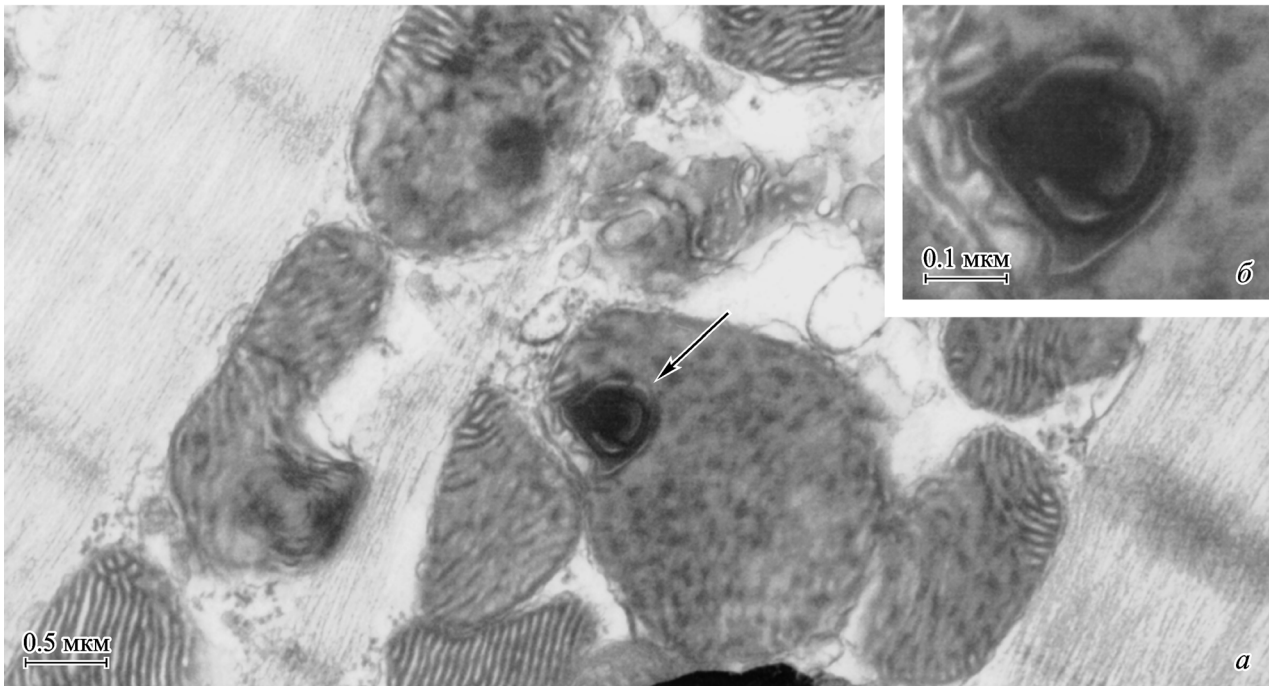


Рис. 5. Электронно-микроскопическая фотография участка кардиомиоцита изолированного кусочка ткани миокарда, инкубированного 24 ч в условиях аноксии.

a — стрелкой показана вновь формирующаяся структура в межмембранном пространстве митохондрии; *б* — видны концентрические, электронно-плотные мембраны с электронно-плотным материалом между ними.

Fig. 5. Electron microphotograph of a fragment of isolated myocardial piece incubated under anoxic conditions for 24 h.

a — arrow shows the newly forming structure in the intermembrane space; *b* — notice concentric electron dense membranes with electron dense material in between.

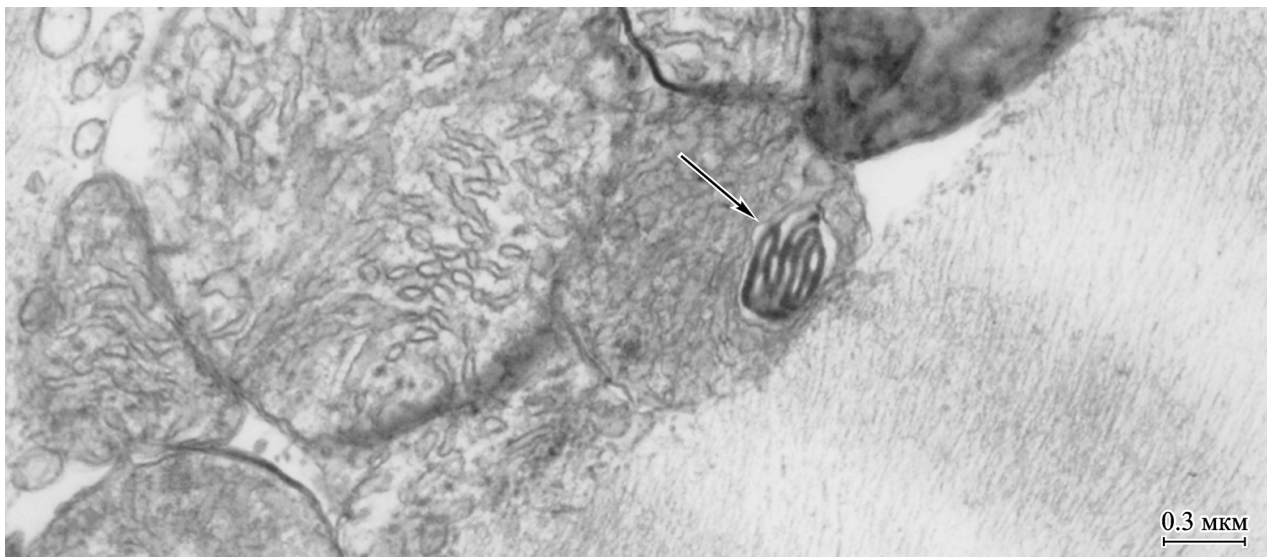


Рис. 6. Электронно-микроскопическая фотография участка кардиомиоцита изолированного кусочка ткани миокарда, инкубированного 24 ч в условиях аноксии.

Стрелкой показана уже хорошо выраженная, соответствующая описанной нами в предыдущих работах структура, названная нами «митохондрией внутри митохондрии».

Fig. 6. Electron micrograph of a fragment of isolated myocardial piece incubated under anoxic conditions for 24 h.

Arrow shows a well pronounced structure, described in our previous studies as «mitochondrion inside mitochondrion».

митохондрий с хорошо выраженными кристами. По размерам, ультраструктуре и расположению крист «промитохондрии» соответствуют электронно-плотным митохондриям, обнаруженным нами при длительной инкубации кусочков миокарда в условиях аноксии.

Возникновение электронно-плотных митохондрий в наших экспериментах на изолированных кусочках миокарда, инкубированных в условиях аноксии, также сопоставимо с описанным Артюхиной и Саркисовой (1977) образованием в клетках мозга крыс при острой гипоксии, возникающей в результате перевязки обеих сонных артерий, популяции мелких электронно-плотных митохондрий. По данным этих авторов, уже через 1 ч после перевязки сонных артерий у крыс наблюдались изменения ультраструктуры митохондрий в нейронах мозга. Процесс постепенного восстановления двигательных реакций через 48 ч после острой ишемии мозга сочетался с появлением в клетках мозга большого числа мелких митохондрий (Артюхина, Саркисова, 1997). По своим ультраструктурным признакам митохондрии, появляющиеся в нейронах мозга в результате острой гипоксии, сопоставимы с электронно-плотными митохондриями, возникающими в кардиомиоцитах изолированных кусочков миокарда после длительного воздействия аноксии.

Для ткани миокарда в литературе также показано возникновение популяции мелких электронно-плотных митохондрий. Так, на материале синусного узла больших с синдромом удлинённого интервала Q—T были обнаружены очаги апоптоза среди кардиомиоцитов нормальной ультраструктуры (James et al., 1993; James, 1994). У больных с синдромом удлинённого интервала Q—T наблюдались жизнеугрожающие тахикардии; очевидно, вследствие тахикардии происходили изменения мелких артерий и артериол. Авторы считают, что кардиомиоциты получают практически все субстраты метаболизма, а также кислород из капилляров, поэтому, по их мнению, деструктивные изменения мышечных клеток связаны с действием гипоксии. В очагах апоптоза авторы обнаружили дегенерирующие кардиомиоциты с фрагментами ядра, обломками органелл с полной разборкой миофибрилл — апоптотные тела. Кардиомиоциты, расположенные рядом с дегенерирующими кардиомиоцитами, имели большие скопления мелких митохондрий незначительных размеров; в некоторых клетках их размеры были чрезвычайно малы (около 0.1 мкм). Эти изменения ультраструктуры популяции митохондрий кардиомиоцитов были названы авторами термином «плеоморфный микромитохондриоз». Авторы высказывают предположение о том, что обнаруженное ими явление — плеоморфный микромитохондриоз — является проявлением ранних стадий развития апоптоза в кардиомиоцитах, в то время как дегенерирующие кардиомиоциты с дезинтеграцией ядра, конденсацией органелл и разборкой миофибрилл характеризуют более поздние фазы апоптоза.

Сопоставляя результаты наших исследований с литературными данными, можно предположить, что обнаруженные нами в условиях аноксии глубокие морфологические изменения митохондриальной популяции кардиомиоцитов отражают механизм выживания клетки в условиях дегенеративных изменений, когда уже запущен механизм апоптоза. Образование «митохондрий внутри митохондрий» — это, очевидно, особый путь деградации митохондрий, отражающий именуемую в литературе точку зрения о том, что нормально метаболизирующая митохондрия никогда не деградирует как «целая едини-

ца, подвергаясь полной разборке митохондрий, доходящей до стадии полипептидов, глицерина, жирных кислот и т. д., а представляет собой „пластичную” структуру, в которой постоянно осуществляется деградация и обновление белковых, липидных и других компонентов» (Лузиков, 1980).

В настоящее время на модельных экспериментах показано, что одним из первых ультраструктурных признаков развития апоптоза в клетках является преобразование популяции митохондрий в мелкие, электронно-плотные органеллы. Это явление описано для многих клеток культуры тканей (De Vos et al., 2000; Sanchez-Alcazar et al., 2000; Frank et al., 2001; Skulachev et al., 2004). Однако ультраструктурный механизм этого явления в настоящее время неизвестен. Возможно, что обнаруженный нами процесс образования мелких электронно-плотных митохондрий в кардиомиоцитах изолированного миокарда при аноксии отражает один из возможных механизмов этого явления.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-48121 и 03-04-48906).

Список литературы

- Артюхина И. И., Саркисова К. Ю. 1997. Ультраструктурные изменения митохондрий в мозге у крыс с разным типом поведения как показатель тяжести ишемии мозга. Докл. РАН. 357 : 839—843.
- Кроленко С. А., Рижамадзе Н. А. 1979. Разрушение миофибрилл во время распространяющегося повреждения. III. Изолированные мышцы крысы. Цитология. 21 : 1016—1020.
- Лузиков В. Н. 1980. Регуляция формирования митохондрий. М.: Наука. 318 с.
- Мейсель М. Н., Бирюзова В. И., Волкова Т. М., Малаятня М. Н., Медведева Г. А. 1964. Функциональная морфология и цитохимия митохондриального аппарата микроорганизмов. В кн.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки. М.; Л.: Наука. 1—15.
- Сапрунова В. Б., Бакеева Л. Е., Ягужинский Л. С. 2003. Ультраструктура митохондриального аппарата кардиомиоцитов крыс при апоптозе, индуцированном длительным действием аноксии. Цитология. 45 (11) : 1073—1082.
- Сапрунова В. Б., Казимирчук С. А., Тоньшин А. А., Бакеева Л. Е., Ягужинский Л. С. 2002. Индукция апоптоза в миокарде в условиях аноксии. Биохимия. 67 (2) : 293—302.
- Тоньшин А. А., Сапрунова В. Б., Солодовникова И. М., Бакеева Л. Е., Ягужинский Л. С. 2003. Функциональная активность и ультраструктура митохондрий, выделенных из апоптотной ткани сердца. Биохимия. 68 (8) : 1070—1078.
- De Vos K., Severin F., Van H., Vancompernelle K., Goossens V., Hyman A., Grooten J. 2000. Tumor necrosis factor induces hyperphosphorylation of kinesin light chain and inhibits kinesin-mediated transport of mitochondria. J. Cell Biol. 149 : 1207—1214.
- Frank S., Gaume B., Bergmann L., Leitner W. W., Robert E. G., Catez F., Smith C. L., Youle R. J. 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. Develop. Cell. 1 : 515—525.
- James T. N. 1994. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. Circulation. 90 : 556—573.
- James T. N., Terasaki F., Pavlovich E. R., Vikhert A. M. 1993. Apoptosis and pleomorphic micromitochondriosis in the sinus nodes surgically excised from five patients with the long QT syndrome. J. Lab. Clin. Med. 122 : 309—323.
- Linnane A. W., Vitols E., Nowland P. G. 1962. Studies on the origin of yeast mitochondria. J. Cell Biol. 13 : 345—350.

Luzikov V., Zubatov A., Rainina E., Bakeeva L. E. 1971. Degradation and restoration of mitochondria upon deaeration of aerobically grown. *Biochim. biophys. acta.* 245 : 321—334.

Plattner H., Schatz G. 1969. Promitochondria of anaerobically grown yeast. III. Morphology. *Biochemistry.* 8 : 339—343.

Sanchez-Alcazar J. A., Schneider E., Martinez M. A., Carmo P., Hernandez-Munoz I., Siles E., De La Torre P., Ruiz-Cabello J., Garcia I., Solis-Herruzo J. A. 2000. Tumor necrosis factor- α increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J. Biol. Chem.* 275 : 13 353—13 361.

Skulachev V. P., Bakeeva L. E., Chernyak B. V., Domnina L. V., Minin A. A., Pletjushkina O. Y., Saprunova V. B., Tsyplenkova V. G., Vasiliev J. M., Yaguzhinsky L. S., Zorov D. B. 2004. Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* 256—257 (1—2) : 341—358.

Wallace P. G., Huang M., Linnane A. W. 1968. The biogenesis of mitochondria. II. The influence of medium composition on the cytology of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 37 : 209—220.

Поступила 3 IV 2006

DYNAMICS OF MITOCHONDRIAL ULTRASTRUCTURE IN SMALL PIECES OF CARDIAC TISSUE UNDER LONG-TERM ANOXIC INCUBATION

I. M. Solodovnikova, V. B. Saprunova, L. E. Bakeeva,¹ L. S. Yaguijinsky

A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119899;
¹ e-mail: bakeeva@imec.msu.ru

Anoxic incubation of isolated small pieces of cardiac tissue for 72 h caused emergence of an unusual population of mitochondria, referred to as «mitochondrion inside mitochondrion». We studied dynamics of the origin of this event. In the most part of a mitochondrial population after a 6 h anoxic incubation of myocardial tissue, a local increase in some region of the intermembrane space was observed. Some regions of matrix with adjoined inner membrane move into these regions of intermembrane space, to be constricted eventually. After 12 h of incubation densely neighbouring layers of membrane are observed in these structures. By 24 h of incubation, inside new-formed structures well-distinguished concentric layers of membrane appear. Between these layers some electron-dense material ultrastructurally identical to mitochondrial matrix is seen. By 72 h of anoxic incubation, in cardiomyocytes of the experimental tissue structures with well-marked morphological features of mitochondria appear, which we called «mitochondrion inside mitochondrion». Results of our study are discussed in terms of a conception of changes that occur in the structure of mitochondrial reticulum during apoptosis.

Key words: mitochondria, cardiomyocytes, electron microscopy, apoptosis, anoxia.