

## ВЫЯВЛЕНИЕ ЦИТОХРОМ *c*-ОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В МИТОХОНДРИЯХ КАРДИОМИОЦИТОВ ИЗОЛИРОВАННОЙ ТКАНИ МИОКАРДА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ДЕЙСТВИИ ГИПОКСИИ

© В. Б. Сапрунова, И. М. Солодовникова, Л. Е. Бакеева<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup> электронный адрес: [bakeeva@imec.msu.ru](mailto:bakeeva@imec.msu.ru)

Методом электронно-микроскопической гистохимии для выявления активности цитохром *c* оксидазы митохондрий с использованием 3,3'-диаминобензидина (ДАБ) показано, что длительное действие гипоксии на кусочки изолированной ткани миокарда, вызывающее ультраструктурные изменения митохондрий, сопровождается нарушением функциональной активности основной популяции митохондрий, в частности IV комплекса дыхательной цепи митохондрий. При этом во вновь возникающих мелких, электронно-плотных, митохондриях хорошо выявляется цитохром *c*-оксидазная активность по всей длине образующихся крист. Полученные результаты обсуждаются в рамках представлений о внутриклеточной регенерации и преобразованиях митохондриального аппарата клетки при митоптозе.

Ключевые слова: ультраструктура митохондрий, кардиомиоциты, гипоксия, внутриклеточная регенерация, апоптоз, митоптоз.

Принятые сокращения: ДАБ — 3,3'-диаминобензидин.

Ранее нами на изолированных кусочках миокарда при экспериментальном моделировании длительных условий гипоксии без последующей реперфузии были обнаружены неизвестные ранее изменения ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов (Сапрунова и др., 2002, 2003).

На фоне отсутствия в экспериментальной ткани признаков некроза и при хорошо выраженных характерных ультраструктурных особенностях общей морфологии популяции митохондрий кардиомиоцитов (прежде всего наличия большого количества межмитохондриальных контактов нативной структуры) в кардиомиоцитах возникает особая популяция мелких, электронно-плотных, митохондрий, которые обнаруживаются не только среди миофибрилл, но и внутри более крупных митохондрий кардиомиоцитов. Убедительные доказательства этого необычного явления были получены методом ультратонких серийных срезов (Сапрунова и др., 2003). Прослежена динамика образования и показаны все стадии развития этой структуры в межмембранном пространстве более крупных, электронно-светлых, митохондрий (Солодовникова и др., 2006). Являются ли обнаруженные нами мелкие, электронно-плотные митохондрии поврежденным материалом, от которого митохондрии основной популяции стремятся избавиться? Или в условиях тяжелого, продолжительного стресса митохондрии формируют внутри себя новую митохондрию, имеющую функциональную активность?

В настоящей работе мы провели исследование цитохром *c*-оксидазной активности митохондрий кардиомиоцитов через 3 сут инкубации ткани в условиях гипоксии, используя широко известный метод электронно-микроскопической гистохимии (Seligman et al., 1968; Novikoff,

Goldfischer, 1969; Nonaka et al., 1989; Angermuller et al., 1998; Walker, Banzer, 2004). Метод основан на способности цитохрома *c* окислять 3,3'-диаминобензидин (ДАБ). ДАБ проникает в межмембранное пространство митохондрий, но не проникает в матрикс митохондрий. В комплексе IV дыхательной цепи митохондрий на первом этапе цитохром *c*-оксидазной реакции митохондрий происходит окисление ДАБ цитохромом *c*, что приводит к полимеризации ДАБ в полимер. Полимеры вступают в реакцию с оксидом осмия, образуя осмиофильный осадок. Продукт данной реакции в отличие от методов, основанных на Nadi-реакции, имеет не капельную форму, а проявляется в виде мелкодисперсного осадка, который более точно выявляет цитохром *c* оксидазу в митохондриях, заполняя внутрикристальное пространство и пространство между наружной и внутренней мембранами митохондрий. Благодаря этому места активной работы цитохром *c* оксидазы четко видны на электронно-микроскопических препаратах (Seligman et al., 1968).

### Материал и методика

Тканевой препарат. Сердце декапитированных взрослых крыс линии Wistar (150—180 г) извлекали, ткань желудочков быстро измельчали на кусочки размером 1—3 мм<sup>3</sup> в буферном растворе, содержащем 0.3 М сахарозы, 250 мкМ ЭДТА, 5 мМ Трис, pH 7.4, при 4 °С. 3—5 г полученного препарата помещали в пробирку объемом 10 мл и заливали тем же буфером. Условия гипоксии создавали предварительной продувкой буфера азотом

в течение 30 мин. Продувка удаляла 70—90 % кислорода (количество оставшегося кислорода контролировали с помощью платинового электрода Кларка). Образец быстро герметизировали. Далее изолированные кусочки миокарда инкубировали при 20 °С в течение 72 ч. Изолированные кусочки кардиомиоцитов инкубировали при 20 °С в течение 72 ч.

Электронная микроскопия. Исследование активности цитохром *c* оксидазы проводили по методике, описанной Селигманом с сотрудниками (Seligman et al., 1968). Ткань миокарда фиксировали 3%-ным раствором глутаральдегида в буфере PBS (0.15 мМ NaCl, 27 мМ KCl, 12 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) в течение 10 мин при 4 °С; затем ткань инкубировали в следующем растворе — 5 мг 3,3'-тетрагидрохлорида диаминобензидина, 9 мл 0.05 М фосфатного буфера, pH 7.4, 1 мл каталазы (20 мкг/мл), 10 мг цитохрома *c* и 750 мг сахарозы — в течение 3 ч при 37 °С. Далее ткань отмывали в PBS в течение 1 ч, после чего дофиксировали 1%-ным раствором четырехоксида осмия в течение 1.5 ч и обезвоживали в растворах спиртов с возрастающей концентрацией (70%-ный спирт был насыщен уранил-ацетатом). Материал заливали в эпоксидную смолу Эпон-812. Серийные ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме LKB-III и окрашивали свинцом по Рейнольдсу. Полученные препараты просматривали и фотографировали в электронном микроскопе NU-11В (Hitachi, Япония).

Использованные реактивы: Трис (ICN, США), ЭДТА (Serva, Германия), сахароза (Merck, Германия), ДАБ, каталаза, цитохром *c* и четырехокись осмия (Sigma, США).

## Результаты

На рис. 1 показана электронно-микроскопическая картина участка кардиомиоцита контрольной ткани миокарда, полученная в результате проведения реакции на цитохром *c*-оксидазную активность. Видно, что внутрикристное пространство большинства митохондрий контрольной ткани заполнено электронно-плотным осадком. На рис. 3, *a* показаны митохондрии кардиомиоцита контрольной ткани миокарда при большем увеличении. Можно видеть электронно-плотный осадок между наружной и внутренней мембранами, ограничивающими митохондрию, и во внутрикристном пространстве.

После длительного действия гипоксии картина реакции резко меняется. На рис. 2, *a* дана обзорная электронно-микроскопическая фотография участка кардиомиоцита изолированного кусочка ткани миокарда, инкубированного в течение 72 ч в условиях гипоксии. Можно видеть, что митохондрии, имеющие электронно-плотный матрикс, проявляют хорошо выраженную цитохром *c*-оксидазную активность. Обводненные митохондрии, в частности митохондрии, содержащие электронно-плотную митохондрию, частично или полностью лишены окраски на активность IV комплекса дыхательной цепи. В большинстве случаев в таких митохондриях во внутрикристном и межмембранном пространствах осадок отсутствует (рис. 2, *b*). Однако вновь образованная при инкубации ткани в условиях гипоксии в межмембранном пространстве мелкая, электронно-плотная, митохондрия обладает выраженной реакцией на цитохром *c*-оксидазную активность. Детально картина цитохром *c*-оксидазной активности в мелкой, электрон-

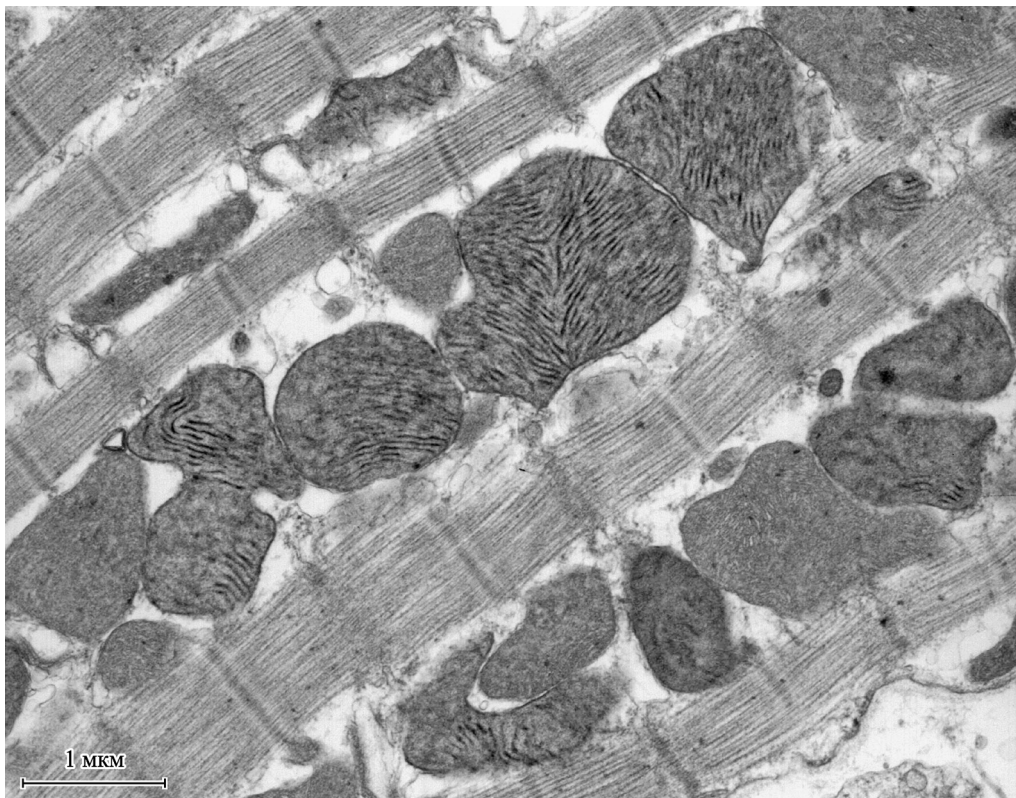


Рис. 1. Электронно-микроскопическая картина участка кардиомиоцита контрольной ткани миокарда в результате реакции на цитохром *c*-оксидазную активность.

Внутрикристное пространство митохондрий заполнено электронно-плотным осадком.



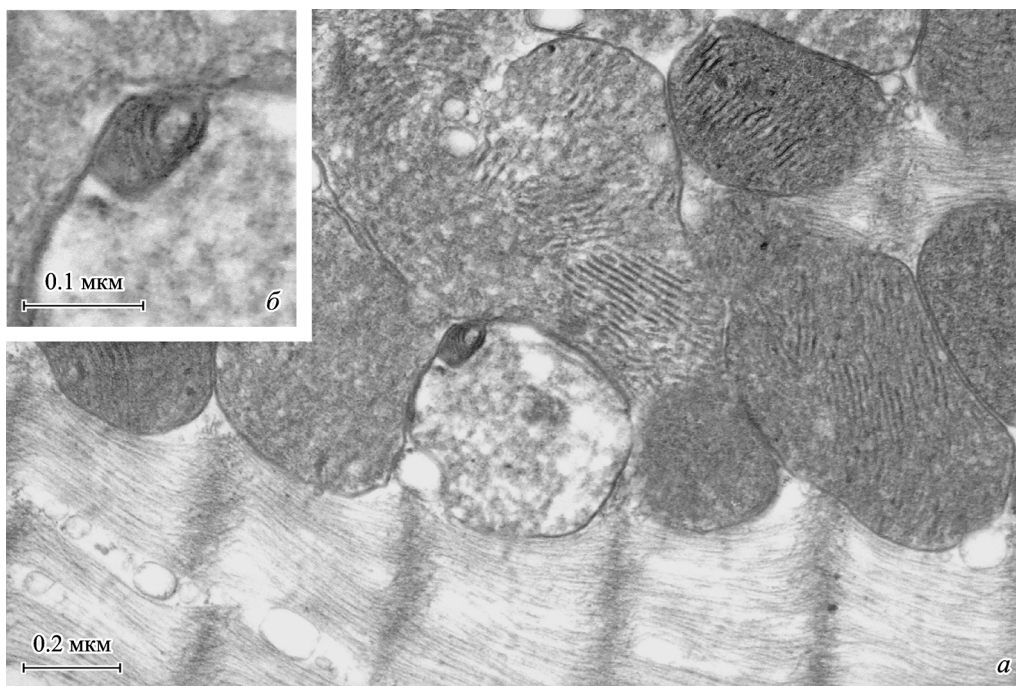


Рис. 2. Электронно-микроскопическая картина участка кардиомиоцита изолированного кусочка ткани миокарда, инкубированного 72 ч в условиях гипоксии. Реакция на цитохром *c*-оксидазную активность.

*a* — общий вид, видна гетерогенность реакций митохондрий; *б* — участок электронно-светлой митохондрии при большем увеличении, проявляющий цитохром *c*-оксидазную активность и содержащий мелкую, электронно-плотную, митохондрию с выраженной цитохром *c*-оксидазной активностью.

но-плотной, митохондрии, расположенной в межмембранном пространстве более крупной, электронно-светлой, показана на рис. 3, *б*. При большем увеличении четко видно, что внутри электронно-плотной митохондрии по всей длине мембран крист присутствует мелкодисперсный осадок, в то время как в основной митохондрии реакция на цитохром *c* оксидазу отсутствует.

При сравнении картины реакции митохондрии контрольной (рис. 3, *a*) и митохондрии экспериментальной

ткани, содержащей мелкую, электронно-плотную, митохондрию (рис. 3, *б*), видна локальная сохранность цитохром *c*-оксидазной активности только лишь в мелкой, электронно-плотной, митохондрии при полном ее отсутствии в основной митохондрии.

Обнаруженная нами активность цитохром *c* оксидазы в электронно-плотных митохондриях, образующихся в межмембранном пространстве митохондрий основной популяции, позволяет предполагать, что механизм обра-

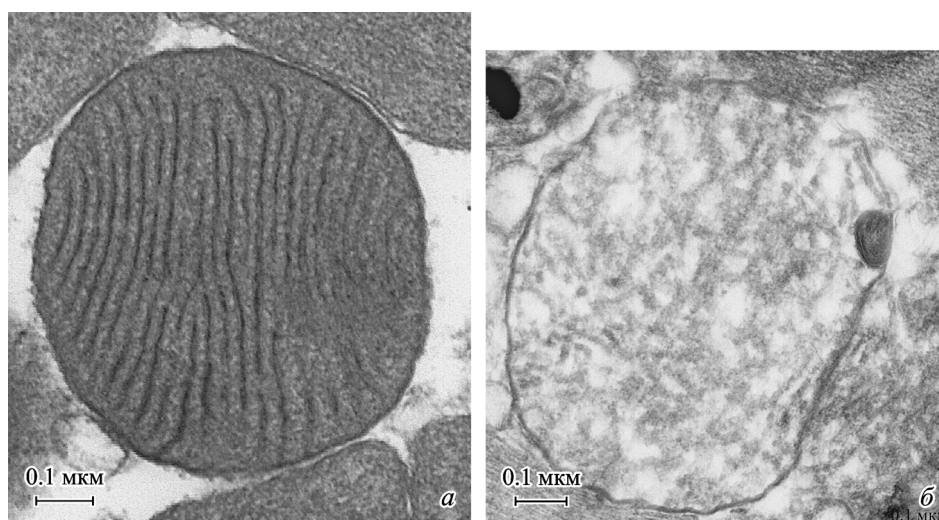


Рис. 3. Электронно-микроскопическая картина митохондрий кардиомиоцитов в результате реакции на цитохром *c*-оксидазную активность.

*a* — митохондрия кардиомиоцита контрольной ткани миокарда с выраженной цитохром *c*-оксидазной активностью; *б* — отсутствие цитохром *c*-оксидазной активности в митохондриях кардиомиоцитов через 72 ч инкубации в условиях гипоксии и цитохром *c*-оксидазная активность мелкой, электронно-плотной, митохондрии, расположенной в межмембранном пространстве электронно-светлой митохондрии.

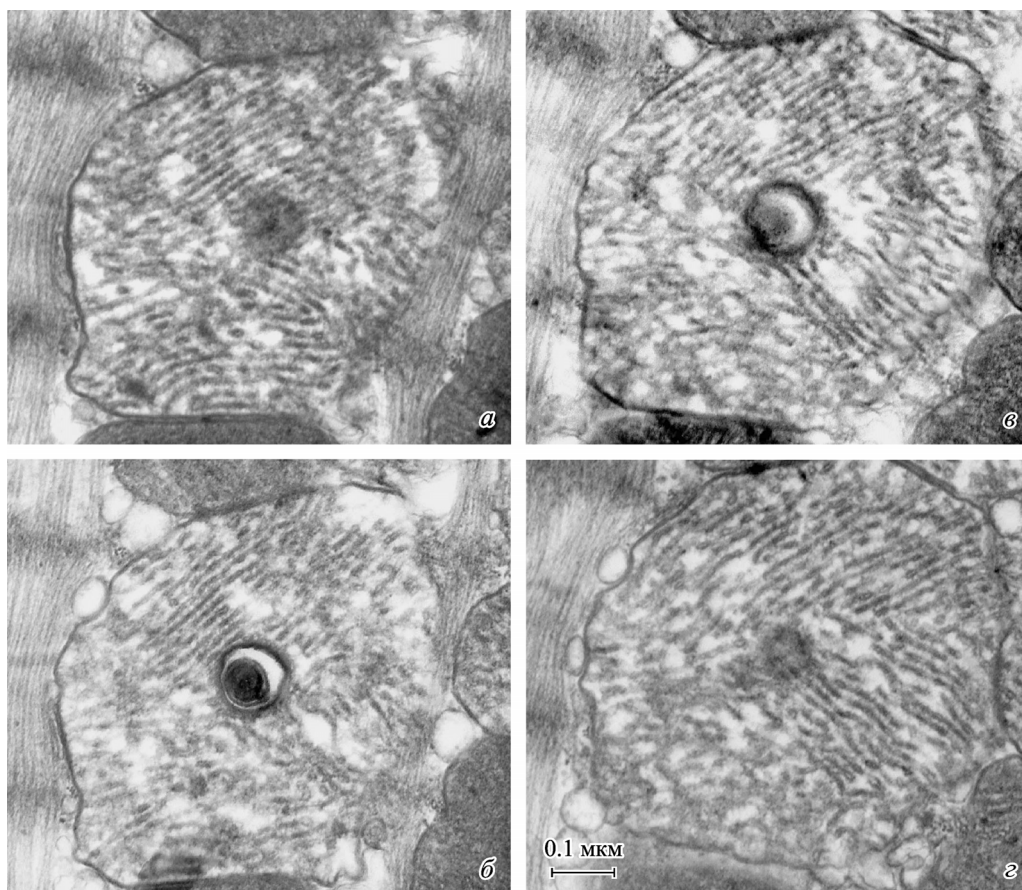


Рис. 4. Электронно-микроскопическая картина реакции на цитохром с оксидазу на серийных срезах, показывающих раннюю стадию образования мелкой, электронно-плотной, митохондрии (а—г).

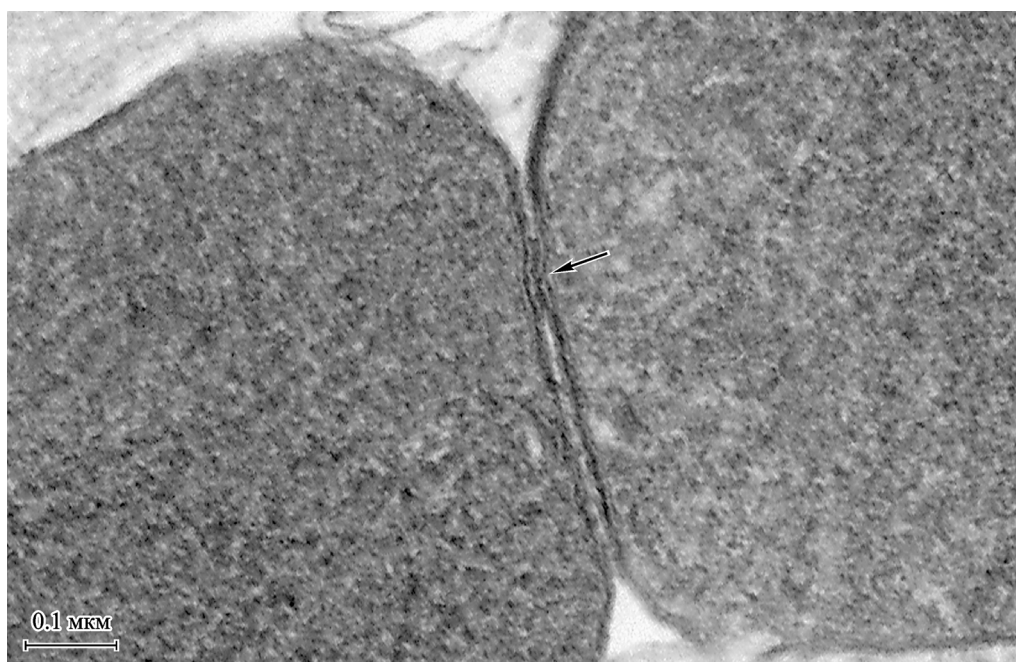


Рис. 5. Электронно-микроскопическая картина распределения активности цитохром с оксидазы в структуре межмитохондриального контакта (стрелка).



зования «митохондрий внутри митохондрий» отражает процесс «выживания» этих органелл, сохраняющих в рабочем состоянии хотя бы часть митохондрии, поскольку, как известно, дисфункция митохондрий вызывает гибель клеток. На рис. 4 показана электронно-микроскопическая картина одной из стадий образования мелкой, электронно-плотной, митохондрии, описанных нами ранее (Солодовникова и др., 2006), при проведении реакции на цитохром *c*-оксидазную активность. На четырех последовательных срезах можно видеть одну из начальных стадий формирования новой митохондрии внутри более крупной митохондрии основной популяции. Видно, что основная митохондрия еще не полностью утратила функциональную активность. Внутрикристное пространство многих крист заполнено электронно-плотным осадком. В центре митохондрии расположена замкнутая полость, ограниченная мембраной, по всей поверхности которой можно видеть хорошо выраженный обильный слой мелкодисперсного осадка. Формирующиеся мембранные слои внутри этой структуры также дают выраженную положительную реакцию на активность цитохром *c* оксидазы, т. е. образование новой мембранной структуры внутри митохондрии идет при активной цитохром *c* оксидазе во вновь дифференцирующемся компартменте.

Как нами было показано ранее, удивительной особенностью наших экспериментальных условий является значительное количество межмитохондриальных контактов нативной структуры в кардиомиоцитах изолированной ткани миокарда после длительного действия гипоксии, причем межмитохондриальные контакты сохранялись даже в суспензии митохондрий, изолированных из данной экспериментальной ткани (Сапрунова и др., 2002; Тоньшин и др., 2003). При исследовании цитохром *c*-оксидазной активности митохондрий кардиомиоцитов в наших экспериментальных условиях оказалось, что в области межмитохондриальных контактов видна ярко выраженная реакция на цитохром *c* оксидазу.

На электронно-микроскопической фотографии распределения активности цитохром *c* оксидазы в структуре межмитохондриальных контактов в ткани миокарда, инкубированной в течение 72 ч в условиях гипоксии (рис. 5), четко видно, что в области межмитохондриального контакта, в пространстве между наружной и внутренней митохондриальной мембранами, выявляется цитохром *c*-оксидазная активность, в то время как в пространстве между ограничивающими данную митохондрию мембранами продукт реакции (мелкодисперсный осадок) не выявляется. Но самое удивительное, что в участке непосредственного контактирования двух митохондрий четко выявляется цитохром *c*-оксидазная активность (на рис. 5 показано *стрелкой*).

### Обсуждение

Результаты наших исследований показывают, что при длительном действии гипоксии в изолированных кусочках ткани миокарда происходят ультраструктурные изменения митохондрий, сопровождающиеся нарушением функциональной активности митохондрий, в частности IV комплекса дыхательной цепи митохондрий. Возникающие при этом в митохондриях основной популяции кардиомиоцитов мелкие, электронно-плотные, митохондрии обнаруживают хорошо различимую цитохром *c*-оксидазную активность по всей длине образующихся крист, в то

время как основная митохондрия, внутри которой формируется новая органелла, частично или полностью утрачивает цитохром *c*-оксидазную активность.

Возникающие в условиях экспериментально вызванной кислородной недостаточности изолированной ткани миокарда особенности митохондрий неотделимы от нарушений функциональных процессов в ткани миокарда, лишенной кислорода. Обширная литература по электронно-микроскопическим, цитохимическим и биохимическим изменениям миокарда изобилует данными, свидетельствующими о том, что наряду с деструктивными процессами в поврежденном миокарде, как правило, протекают регенеративные процессы (Саркисов, Втюрин, 1967; Глаголева, Чечулин, 1968; Саркисов, 1977; Авцын, Шахламов, 1979; Румянцев, 1982). Румянцев (1982) определяет желудочковые миоциты как в высшей степени пластичные клетки, способные к резкой активации биосинтезов и глубокой ультраструктурной реорганизации, включающей в себя новообразование огромного числа специализированных структур и клеточных органелл.

В работе Глаголевой и Чечулина (1968) описывается новообразование миофибрилл, митохондрий и других внутриклеточных структур в клетках миокарда в условиях экспериментальной ишемии. Авторы исследовали ультраструктурную организацию миокарда на различных стадиях экспериментальной ишемии. Было показано, что на 5—7-е сут после перевязки коронарной артерии в мышечных волокнах миокарда обнаруживаются кардиомиоциты, в которых присутствуют скопления мелких (0.5—1.0 мкм) митохондрий, содержащих большое число плотно упакованных крист. Как мы отмечали в наших предыдущих публикациях, аналогичные данные были получены и в более современных работах, выполненных на высоком методическом уровне (James et al., 1993; James, 1994).

Рассмотренные изменения ультраструктуры кардиомиоцитов в литературе трактуются как признаки внутриклеточной регенерации (Саркисов, Втюрин, 1967; Глаголева, Чечулин, 1968; Саркисов, 1977; Авцын, Шахламов, 1979; Румянцев, 1982). В литературе существует точка зрения, согласной которой возможно не только воспроизведение новых митохондрий, но и реконструкция поврежденных органелл. Так, Демлинг с коллегами (Deimling et al., 1960) показали регенерацию крист с внутренней стороны наружной митохондриальной мембраны. Возможно, что эти авторы также наблюдали описанный нами процесс образования митохондрий внутри митохондрий, однако недостаточный методический уровень и низкая разрешающая способность электронных микроскопов тех лет не позволили авторам детально разобраться в обнаруженном ими явлении. Внутриклеточный регенеративный процесс был назван Глаголевой и Чечулиным (1968) частью «борьбы за существование», и эти авторы сделали вывод о том, что восстановление миокардиальных клеток происходит путем внутриклеточной регенерации, которая, по их мнению, является ультраструктурной основой восстановления нарушенной функции сердца.

Отражением борьбы за существование, на наш взгляд, является и повышенная стабильность хорошо выраженных межмитохондриальных контактов в ткани миокарда в наших экспериментальных условиях. Нами впервые удалось получить функциональную характеристику этой межмембранной контактной структуры методом электронно-микроскопической гистохимии, который позволяет сделать вывод: межмитохондриальные контакты

обеспечивают не только механическую интеграцию митохондрий, но и активную метаболическую кооперацию в наших экспериментальных условиях. Эти результаты являются убедительным подтверждением полученных нами ранее данных о высокой электропроводности этих структур (Бакеева и др., 1977; Скулачев, 1989). Таким образом, получено еще одно подтверждение того, что межмитохондриальные контакты можно рассматривать как системобразующие элементы клеточной организации.

Наши экспериментальные данные также можно рассматривать с позиции развиваемых В. П. Скулачевым современных представлений о митоптозе (процессе самоликвидации митохондрий) (Skulachev, 1998, 1999; Скулачев, 1999, 2000, 2005; Skulachev et al., 2004). По мнению В. П. Скулачева, явления самоуничтожения (апоптоза) необходимо рассматривать более широко, не только применительно к тканевой кинетике, но и на субклеточном уровне. В настоящее время очевидно, что митохондрии, подобно клетке, обладают программой самоликвидации (митоптозом). Возможно, что обнаруженная в наших экспериментальных условиях деградация отдельных оргanelл исходной популяции митохондрий, сопровождающаяся появлением мелких, электронно-плотных, митохондрий, является одним из механизмов митоптоза, направленного на выбраковку митохондрий с нарушенной функциональной активностью, поскольку очевидно, что функции митоптоза не исчерпываются только антиоксидантной защитой клетки.

#### Список литературы

- Авцын А. П., Шахламов В. А. 1979. Ультраструктурные патологии клетки. М.: Наука. 320 с.
- Бакеева Л. Е., Скулачев В. П., Ченцов Ю. С. 1977. Митохондриальный ретикулум: строение и возможные функции внутриклеточных структур нового типа в мышечной ткани. Вестн. Москов. ун-та. Сер. биол. 3 : 23—38.
- Глаголева В. В., Чечулин Ю. С. 1968. Ультраструктурная основа нарушения функции сердечной мышцы. М.: Наука. 73 с.
- Румянцев П. П. 1982. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Л.: Наука. 320 с.
- Сапрунова В. Б., Бакеева Л. Е., Ягузинский 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., Ягузинский Л. С. 2002. Индукция апоптоза в миокарде в условиях аноксии. Биохимия. 67 (2) : 293—302.
- Саркисов Д. С. 1977. Очерки по структурным основам гомеостаза. М.: Медицина. 349 с.
- Саркисов Д. С., Втюрин Б. В. 1967. Электронная микроскопия деструктивных и регенераторных внутриклеточных процессов. М.: Медицина. 224 с.
- Скулачев В. П. 1989. Энергетика биологических мембран. М.: Наука. 564 с.
- Скулачев В. П. 1999. Феноптоз: запрограммированная смерть организма. Биохимия. 64 (12) : 1679—1688.
- Скулачев В. П. 2000. Кислород и явление запрограммированной смерти. Первое северинское чтение. М.: ИБМХ РАМН. 47 с.
- Скулачев В. П. 2005. Старение как атавистическая программа, которую можно попытаться отменить. Вестн. РАН. 9 : 831—843.
- Солодовникова И. М., Сапрунова В. Б., Бакеева Л. Е., Ягузинский Л. С. 2006. Динамика изменений ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов изолированного миокарда крысы при длительной инкубации в условиях аноксии. Цитология. 48 (10) : 848—855.
- Тоньшин А. А., Сапрунова В. Б., Солодовникова И. М., Бакеева Л. Е., Ягузинский Л. С. 2003. Функциональная активность и ультраструктура митохондрий, выделенных из апоптотной ткани сердца. Биохимия. 68 (8) : 1070—1078.
- Angermuller S., Kunstle G., Tiegs G. 1998. Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNFalpha-treated galactosamine-sensitized mice. J. Histochem. Cytochem. 46 : 1175—1183.
- Deimling O. V., Moelbert E., Duspiva F. 1960. Electron microscopic demonstration of a glucose-1-phosphate splitting enzyme in the myocardium of the albino rat. Beitr. Pathol. Anat. 123 : 127—143.
- 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.
- Nonaka I., Koga Y., Ohtaki E., Yamamoto M. 1989. Tissue specificity in cytochrome c oxidase deficient myopathy. J. Neurol. Sci. 92 : 193—203.
- Novikoff A. B., Goldfischer S. 1969. Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. J. Histochem. Cytochem. 17 : 675—680.
- Seligman A. M., Karnovsky M. J., Wasserkrug H. L., Harker J. S. 1968. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). J. Cell Biol. 38 : 1—14.
- Skulachev V. P. 1998. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. Biochim. biophys. acta. 1363 : 100—124.
- Skulachev V. P. 1999. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. Mol. Aspects Med. 20 : 139—184.
- 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.
- Walker D. W., Benzer S. 2004. Mitochondrial «swirls» induced by oxygen stress and in *Drosophila* mutant hyperswirl. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101 : 10 290—10 295.

THE CYTOCHROME C OXIDASE ACTIVITY IN MITOCHONDRIA OF CARDIOMYOCYTES  
OF ISOLATED CARDIAC TISSUE UNDER LONG-TERM HYPOXIC INCUBATION*V. B. Saprunova, I. M. Solodovnikova, L. E. Bakeeva*<sup>1</sup>

A. N. Belozersky Research of Physico-Chemical Biology, Institute Moscow State University;

<sup>1</sup> e-mail: [bakeeva@imec.msu.ru](mailto:bakeeva@imec.msu.ru)

Using method of electron microscopic histochemistry based upon the oxidative polymerization of 3,3'-diaminobenzidine (DAB) to reveal cytochrome *c* oxidase activity we identified that long hypoxic incubation of isolated small pieces of cardiac tissue during 72 h caused changes in mitochondrial ultrastructure followed by a breach of functional activities of mitochondria, and, in particular, complex IV of the respiratory chain. But for all that, small electron-dense mitochondria appearing inside electron-light mitochondria («mitochondria inside mitochondria») stained positively for cytochrome *c* oxidase activity along the full length of cristae. The results obtained are discussed in connection with conception of changes in the mitochondrial reticulum ultrastructure during mitoptosis.

Key words: mitochondria, cardiomyocytes, electron microscopy, intracellular regeneration, hypoxia, mitoptosis.

---