

УДК 616.12-02:633.1+576.3:612.273.2

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ МОРФО- И СТЕРЕОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МИТОХОНДРИЙ НА ПРОТРЕБЛЕНИЕ O₂ ТКАНЯМИ ЛЕГКИХ И СЕРДЦА ПРИ ГИПОКСИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Е.В.Розова

Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины, Киев

В экспериментальных исследованиях, проведенных на 96 половозрелых белых лабораторных крысах-самцах массой 220-300 г, проведена оценка взаимосвязи потребления O₂ тканями легких и сердца с изменениями морфо- и стереометрических характеристик митохондрий при гипоксических состояниях, развивающихся при острой гипоксической гипоксии, острой дозированной кровопотере и иммобилизационном стрессе. Полученные результаты свидетельствуют о том, что влияние состояния митохондриального аппарата клеток на потребление кислорода тканью легких и миокарда носит выраженный органоспецифичный характер.

Ключевые слова: *ткани легких и сердца, митохондрии, потребление O₂ тканями, острая гипоксическая гипоксия, острая дозированная кровопотеря, иммобилизационный стресс.*

Введение. Вопросы взаимосвязи структуры и функции в организме человека и животных в течение последних десятилетий привлекают к себе пристальное внимание. Такой интерес обусловлен, прежде всего сформировавшимся мнением о том, что, несмотря на наличие в организме регуляторных систем различного уровня, оптимальное выполнение любой физиологической функции обеспечивается деятельностью ключевых органов, осуществление которой возможно лишь при их структурной сохранности [13; 15; 20]. К фундаментальным научным проблемам подобной направленности относится изучение структурных перестроек митохондрий (МХ) при изменении условий существования организма, в частности при развитии гипоксических состояний различного происхождения [11; 14; 17; 18].

Изменения в функционировании митохондриального аппарата клеток также сопровождают формирование в организме адаптивно-приспособительных или патологических реакций в ответ на эндо- либо экзогенные воздействия, в том числе и приводящие к развитию гипоксии. Главным патогенетическим звеном при кислородном голодании тканей в организме является повреждение митохондрий, сопровождающееся нарушениями энергообеспечения, антиоксидантной защиты, стабильности мембран вследствие интенсификации ПОЛ [2; 11; 16; 17; 19]. Считают, что одними из информативных методов выявления повреждений МХ являются морфологические с последующим морфо- и

стереометрическим анализом полученных результатов [3; 8]. При этом, по нашему мнению, при изучении МХ следует учитывать тот факт, что влияние на организм гипоксических состояний разного генеза имеет выраженную органоспецифичность. Однако, исследования изменений МХ под таким углом зрения, особенно с проведением выявления корреляционных связей морфофункционального состояния митохондриального аппарата с потреблением O_2 тканями организма до настоящего времени не проводилось.

В связи с вышесказанным, нами проведена оценка взаимосвязи потребления O_2 тканями легких и сердца с изменениями морфо- и стереометрических характеристик МХ при гипоксических состояниях различного генеза.

Материал и методика. Исследование изменений, происходящих в митохондриальном аппарате клеток легких и сердца, проведено на 96 половозрелых белых лабораторных крысах-самцах массой 220-300 г. Работу с лабораторными животными осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986) и с принципами Хельсинской Декларации (2000).

Моделирование гипоксических состояний осуществлялось следующим образом. Гипоксическая гипоксия (Г) создавалась с помощью газовой смеси, содержащей 7% кислорода в азоте при помещении животных в герметичную камеру, объемом 10 л. Подача газовой смеси осуществлялась постоянно с помощью усовершенствованного насоса Atman-air pump (КНР), при поглощении CO_2 с помощью поглотителя (прокаленной натронной извести). Экспозиция гипоксической смеси составляла 30 мин. Циркуляторно-гемическую гипоксию моделировали при острой кровопотере (Кр), составлявшей 25-30% от объема циркулирующей крови (ОЦК) без возмещения объема отобранной крови. Забор крови осуществляли из хвостовой артерии (после разогревания хвоста с помощью грелки) в течение 3-4 мин (антикоагулянт: гепарин 10 ЕД на 100 г массы тела животного). Период от окончания забора крови до декапитации животного составлял 30 мин. Острый 6-и часовой иммобилизационный стресс (С), при котором в развитии гипоксического состояния принимает участие целый набор факторов (респираторные и циркуляторные нарушения, регионарная ишемия, катехоламинзависимые процессы и т.п.), создавали путем фиксации животных в положении на спине [3; 6; 7; 9]. Контрольная группа составляла 15 особей.

Возможность проведения сравнительного анализа изменений, происходящих в системах дыхания, кровообращения, газообмена организма, а также в морфофункциональном состоянии тканей легких и сердца при указанных воздействиях на организм обуславливается тем,

что при них происходит развитие вторичной тканевой гипоксии сравнимой степени, свидетельством чего являются уровни соотношения доставки O_2 к его потреблению, характеризующие выраженность тканевой гипоксии (рис. 1).



Р и с . 1 . Изменение соотношения доставки O_2 к его потреблению при гипоксической гипоксии (Г), кровопотере (Кр), иммобилизационном стрессе (С):

К – контрольный уровень, * – различия достоверны относительно контроля

Скорость потребления O_2 тканями ($V't_{O_2}$) легких и сердца определяли с помощью манометрического метода Варбурга в модификации Емельянова [4].

Электронномикроскопические исследования митохондриального аппарата в тканях легких и сердца осуществляли в препаратах, изготовленных из идентичных участков нижних долей обоих легких и верхушки сердца. Фиксацию материала производили немедленно, внося образцы ткани в забуференный 2,5% раствор глутарового альдегида. Дофиксация материала осуществлялась с помощью реактива Колфилда (на основе 2% раствора четырехоксида осмия, рН - 7,3) (все используемые реактивы фирмы Sigma, США); обезвоживание материала производили в спиртах возрастающей концентрации, абсолютных спирте и ацетоне; последующая заливка в эпон-аралдит (фирмы Fluka, Швейцария) проводилась по общепринятой методике. Ультратонкие срезы толщиной 40-60 нм для просмотра в электронном микроскопе контрастировали 1% раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца (все используемые реактивы фирмы Sigma,

США) по методике Рейнольдса [5]. Просмотр препаратов осуществляли с помощью электронных микроскопов JEM 100СХ (Япония) и ПЕМ-125К (Украина).

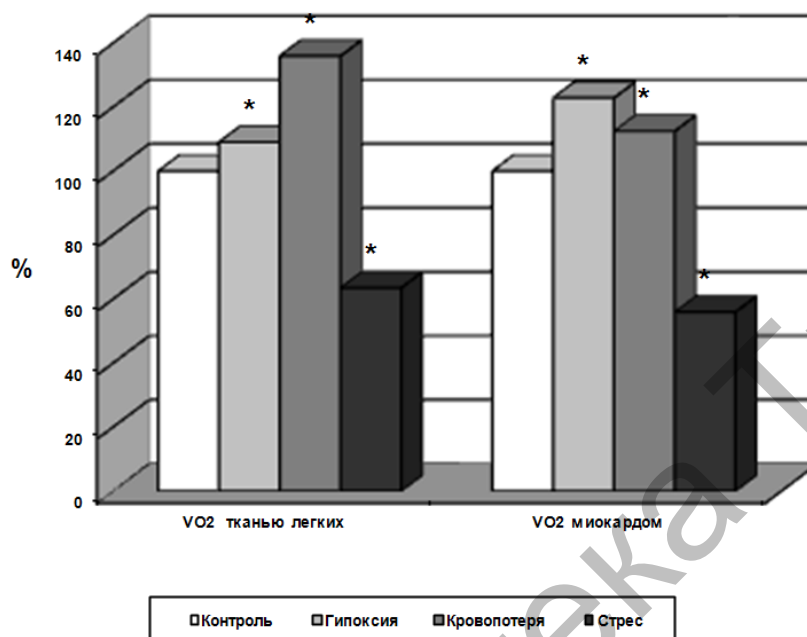
Морфометрические и стереометрические исследования проводили, базирясь на подходах Вейбеля [1; 12] с использованием компьютерной программы для морфометрических подсчетов Image Tool Version 3 (США). Оценивали общее количество МХ (n) и количество структурно измененных органелл (nd) на единице площади исследуемой ткани, средний диаметр МХ (d), средняя площадь МХ (S) и сумму поверхностей МХ в единице объема ткани ($S_{i\text{tot}}$).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета программ «Microsoft Excel 2003» с использованием критерия t Стьюдента. При этом определяли: средние арифметические величины (M), стандартную ошибку средней величины (m), коэффициент корреляции Пирсона (r). Оценивали силу связи между показателями, считая значения коэффициентов корреляции равные 0,3 и менее, показателями слабой связи; значения более 0,4, но менее 0,7 - показателями умеренной связи, а значения 0,7 и более - показателями высокой степени связи [10]. Различия между средними величинами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Исследования показали, что при всех используемых воздействиях наблюдались изменения потребления O_2 тканью легких и сердца, причем при сохранении направленности изменений в обеих тканях, степень выраженности отличалась (рис. 2). При иммобилизации происходило снижение V'_{TO_2} практически одинаковое как в ткани легких, так и в миокарде. При двух других воздействиях имело место возрастание V'_{TO_2} : в легочной ткани более выраженное при кровопотере, а в миокарде – при гипоксической гипоксии.

Поскольку главными структурами, ответственными за энергетический метаболизм (к которому относится и скорость потребления кислорода тканью) являются митохондрии, можно проанализировать, какие морфо- и стереометрические характеристики могут быть наиболее связаны с изменениями V'_{TO_2} при всех схемах эксперимента, сопоставив их с уровнями скорости потребления кислорода тканью легких и миокардом.

Было выявлено, что в ткани легких при всех изучаемых воздействиях на организм (в данном случае зависимость от вида воздействия не была выявлена) изменения V'_{TO_2} наиболее тесно связаны с общим количеством МХ и суммой поверхностей МХ в единице объема ткани (таблица).



Р и с . 2 . Изменения скорости потребления кислорода тканью легких и миокардом при изучаемых воздействиях:
* – различия достоверны относительно контроля (p<0,05)

Существенно меньшее влияние на $V'_{T_{O_2}}$ оказывают изменение площади МХ, а также структурные изменения в МХ, с количеством которых наблюдается отрицательная корреляционная связь. Изменение диаметра органелл практически не влияет на потребление кислорода тканью легких.

Т а б л и ц а
Взаимосвязь $V'_{T_{O_2}}$ и основных морфо- и стереометрических характеристик митохондрий (r – средние коэффициенты корреляции Пирсона)

Параметры	Ткань легких (r)	Миокард (r)	
		СС МХ	ИМФ МХ
n	0,766*	0,545	0,295
nd	-0,501	-0,214	-0,709*
d	-0,080	0,320	0,477
S	0,512	0,553	0,211
S itot	0,731*	0,669*	0,345

Примечание: 1. СС МХ – субсарколеммальная субпопуляция митохондрий; ИМФ МХ – интрамиофибриллярная субпопуляция митохондрий. 2. * - тесная связь между параметрами; полужирным курсивом выделены коэффициенты, указывающие на среднюю степень связи между параметрами.

Что касается миокарда, то наблюдаются несколько иные зависимости $V'_{T_{O_2}}$ от состояния митохондриального аппарата кардиомиоцитов. Прежде всего следует отметить, что $V'_{T_{O_2}}$ по-разному

зависит от морфо- и стереометрических характеристик МХ субсарколеммальной (СС) и интрамиофибриллярной (ИМФ) субпопуляций. Наибольшее влияние на скорость потребления кислорода миокардом оказывают сумма поверхностей СС МХ в единице объема ткани и количество структурно измененных ИМФ МХ. Несколько менее зависимым оказывается V'_{TO_2} от площади СС МХ, их общего количества, а также диаметра ИМФ МХ. Остальные же морфо- и стереометрические параметры МХ, по всей видимости, существенно не влияют на уровень скорости потребления O_2 миокардом: наблюдалась слабая положительная корреляционная зависимость V'_{TO_2} с диаметром СС МХ, с количеством и площадью ИМФ МХ и слабая отрицательная корреляционная зависимость V'_{TO_2} с количеством структурно измененных СС МХ и с суммой поверхностей ИМФ МХ в единице объема ткани. Данный анализ также показал, что V'_{TO_2} тканью миокарда в несколько большей степени определяется состоянием субсарколеммальной субпопуляции органелл.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что влияние состояния митохондриального аппарата клеток на потребление кислорода тканью легких и миокарда носит выраженный органоспецифичный характер.

Список литературы

1. Вейбель Э.Р. Морфометрия легких человека. М.: Медицина, 1970. 170 с.
2. Васюк Ю.А., Куликов К.Г., Кудряков О.Н., Крикунова О.В., Садулаева И.А. Вторичная митохондриальная дисфункция при остром коронарном синдроме // РФК. 2007. № 1. С. 41–47.
3. Дигурова И.И., Ноздрачев А.Д., Гагарин В.В., Гуцин А.Г., Карева Ю.В. Оценка микроциркуляторных изменений при воздействии некоторых экстремальных факторов // Вестн. СПбГУ. Сер. 3. 2007. С. 65–73.
4. Емельянов Н.А. Измерение выделения или поглощения газов волюметрическим методом с помощью аппарата Варбурга // Украинский биохимический журн. 1971. Т. 43, № 3. С. 390–392.
5. Карупу В.Я. Электронная микроскопия. Киев: Вища школа, 1984. 208 с.
6. Ложкин А.В. Методы оценки объема и степени кровопотери // Вестн. службы крови России. 2004. № 4. С. 39–47.
7. Малкин В.Б., Гиппенрейтер Е.Б. Острая и хроническая гипоксия. М.: Наука, 1977. 319 с.
8. Манских В.Н. Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза // Бюл. сибирской медицины. 2004. № 1. С. 63–70.

9. *Меерсон Ф.З.* Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации. М.: Медицина, 1993. 331 с.
10. *Осипов В.П., Лукьянова Е.М., Антипкин Ю.Г.* Методика статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях. Киев: Планета людей, 2002. 200 с.
11. *Солодовникова И.М., Сапрунова В.Б., Бакеев Л.Е., Ягузинский Л.С.* Новообразование митохондрий при апоптозе; подавление антиоксидантами // Рецепция и внутриклеточная сигнализация: материалы конф. Пушино, 2005. С. 284.
12. *Ташке К.* Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. Бухарест: Изд-во Акад. СРР, 1980. 192 с.
13. *Терещенко С.Н., Джагани Н.А., Жук М.Ю., Жиров И.В.* Отёк лёгких: диагностика и лечение на догоспитальном этапе. М.: СМП МГМСУ, 2007. 26 с.
14. *Тодоров И.П.* Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологии, процессе старения и апоптозе // Рос. химический журн. 2007. Т. 51, № 1. С. 93–106.
15. *Botto L., Beretta E., Daffara R., Miserocchi G., Palestini P.* Biochemical and morphological changes in endothelial cells in response to hypoxic interstitial edema // *Respir. Res.* 2006. Vol. 7, № 1. P. 7–18.
16. *Cereghetti G.M., Scorrano L.* The many shapes of mitochondrial death // *Oncogene.* 2006. Vol. 25, № 34. P. 4717–4724.
17. *Collins T.J., Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D.* Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells // *EMBO J.* 2002. Vol. 21, № 12. P. 1616–1627.
18. *Guderley H., Turner N., Else P.L., Hulbert A.J.* Why are some mitochondria more powerful than others: Insights from comparisons of muscle mitochondria from three terrestrial vertebrates // *Comp. Biochem. Physiol.* 2005. Vol. 142, Part B. P. 172–180.
19. *Karbowski M., Youle R.J.* Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis // *Cell Death and Differentiation.* 2003. № 10. P. 870–880.
20. *Wasowicz M., Sobczynsky P., Drwila R., Marszalek A., Biczysko W., Andres J.* Air-blood barrier injury during cardiac operations with the use of cardiopulmonary bypass (CBP). An old story? A morphological study // *Scand. Cardiovasc. J.* 2003. Vol. 37, № 4. P. 216–221.

**INFLUENCE OF MORPHO- AND STEREOMETRIC
CHARACTERISTICS CHANGES OF MITOCHONDRIA ON O₂
CONSUMPTION IN LUNG AND HEART TISSUE UNDER HYPOXIC
CONDITIONS OF VARIOUS GENESIS**

E.V. Rozova

Bogomolets Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

In the experimental work carried out on 96 adult white laboratory male rats weighing 220-300 g, evaluated the relationship of O₂ consumption of lung and heart tissues with changes of morpho- and stereometric characteristics of mitochondria under hypoxic conditions, developing by acute hypoxic hypoxia, acute dosage blood loss and immobilization stress. The results indicate that the influence of the cells mitochondrial apparatus state on oxygen consumption of lungs tissue and myocardium has expressed organospecific character.

Keywords: *lung and heart tissues, mitochondria, tissues O₂ consumption, acute hypoxic hypoxia, acute dosage blood loss, immobilization stress.*

Об авторах:

РОЗОВА Екатерина Всеволодовна—кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела по изучению гипоксических состояний, Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, 01024, Киев-24, ул. Богомольца, 4, e-mail: erozova@ukr.net