

М.Ю.Колесник

Запорожский государственный
медицинский университет

Ключевые слова: кардиомиоциты, спонтанно гипертензивные крысы, митохондрии, сахарный диабет, морфологические изменения.

Надійшла: 14.01.2013

Прийнята: 22.02.2013

УДК 616.127-091.8:616-0.19.1-008.6]:616.12-008.331.1.-021.3:616.379-008.64-0.92.9:599.324.2

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ РАЗВИТИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У СПОНТАННО ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Резюме. Концепция энергетического дефицита в патогенезе артериальной гипертензии и сахарного диабета открывает новые перспективы для понимания молекулярно-биохимических механизмов этих заболеваний. Проведено сопоставление морфологических изменений кардиомиоцитов и выраженности митохондриальной дисфункции у спонтанно гипертензивных крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Состояние митохондрий оценивали путем исследования проницаемости гигантской митохондриальной поры. Установлено, что у спонтанно гипертензивных животных достоверно увеличивается проницаемость митохондриальной поры. При развитии экспериментального сахарного диабета регистрируется более выраженное увеличение проницаемости митохондрий. При этом у диабетических животных отмечается увеличение площади ядер кардиомиоцитов и снижение ядерно-цитоплазматического коэффициента. Показано, что концентрация РНК в ядрах и цитоплазме кардиомиоцитов достоверно снижается по сравнению с интактными гипертензивными животными. Нарушение биосинтеза РНК в миокарде гипертензивных животных с экспериментальным сахарным диабетом ассоциируется с тяжестью митохондриальной дисфункции.

Морфологія. – 2013. – Т. VII, № 1. – С. 44-48.

© М.Ю.Колесник, 2013

Kolesnyk M.Yu. The morphological changes of cardiomyocytes and mitochondrial dysfunction in spontaneous hypertensive rats with experimental diabetes mellitus.

Summary. The conception of energetic deficiency in the pathogenesis of arterial hypertension and diabetes mellitus presents new perspectives in the understanding of molecular and biochemical mechanisms of these diseases. It was performed the comparison between morphological changes and mitochondrial dysfunction in spontaneous hypertensive rats with experimental diabetes mellitus. The mitochondrial state was assessed by investigation of the permeability of the giant mitochondrial pore. It was found that the permeability of mitochondrial pore is increased in spontaneous hypertensive rats. It was registered the significant increasing of mitochondrial membrane permeability in case of diabetes. It was observed the increased area of cardiomyocytes' nuclei and decreased nuclear cytoplasmic ratio in diabetic animals. It was demonstrated that nucleic and cytoplasmic RNA concentration is decreased in comparison with the intact spontaneous hypertensive rats. The RNA biosynthesis abnormalities are associated with the degree of mitochondrial dysfunction in the myocardium of spontaneous hypertensive rats with experimental diabetes mellitus.

Key words: cardiomyocytes, spontaneous hypertensive rats, mitochondria, diabetes mellitus, morphological changes.

Введение

Артериальная гипертензия (АГ) и сахарный диабет 2-го типа (СД) представляют собой две важнейшие медико-социальные проблемы здравоохранения. Распространенность этих заболеваний достигает масштабов неинфекционной пандемии во всем мире. По данным Международной Федерации Диабета (IDF, 2011), число больных СД в ближайшие 20 лет увеличится в 2 раза и достигнет 552 млн. человек. АГ страдает треть взрослого населения во всем мире. Нали-

чие общих факторов риска и патофизиологических механизмов обуславливают частое сочетание этих двух патологий. Успехи современной фармакотерапии позволили в определенной степени замедлить патологическое ремоделирование органов-мишеней и уменьшить частоту осложнений. Однако, долгосрочный прогноз лиц, имеющих эти заболевания, остается неблагоприятным.

Изучение молекулярно-биохимических механизмов поражения органов-мишеней при АГ и

СД является перспективным направлением современной медицины. Исследования в этой сфере позволят перейти на новый концептуальный уровень фармакотерапии на основе кардиопротекции (Мойбенко А.А. и соавт., 2008).

Известно, что морфологическими признаками поражения миокарда при АГ и СД являются патологическая гипертрофия и прогрессирующий фиброз миокарда. Экспериментальные данные свидетельствуют об определенной последовательности изменений рабочих клеток миокарда, включающей фазы “адаптационной гипертрофии” и “дисрегенераторной перестройки” их ультраструктуры (Гавриш А.С., 2005). Параллельно происходят изменения интерстиция, проявляющиеся накоплением в нем продуктов нарушенного тканевого метаболизма и отеком, что усугубляет трофику кардиомиоцитов. В условиях патологической гипертрофии большинство новообразованных органелл, в частности митохондрий, структурно и функционально неполноценны. В последние годы появились экспериментальные работы, которыми показано, что нарушение нормальной регуляции артериального давления происходит на фоне развивающегося энергетического дефицита (Постнов Ю.В., 2005; Дорошук А.Д., 2007; Gustaffson A., Gottlieb R., 2008). В этой связи большой интерес представляет исследование состояния митохондрий.

Ранее нами было показано, что в условиях экспериментального сахарного диабета у крыс со спонтанной гипертензией регистрируется выраженный дефицит адениловых нуклеотидов и лактата в митохондриях (Колесник М.Ю. и соавт., 2012). Это является результатом нарушения функционирования клеточных органелл в условиях артериальной гипертензии и метаболических нарушений. В настоящее время в качестве одного из интегральных маркеров митохондриальной дисфункции рассматривают состояние митохондриальной поры (Акопова О.В., 2008). Она представляет собой высокоселективный потенциал-зависимый ионный канал внутренней мембраны диаметром 3 нм, способный пропускать молекулы размером менее 1,5 кДа. Важнейшая роль митохондриальной поры (МП) заключается в поддержании необходимых рН-градиента и мембранного потенциала для осуществления окислительного фосфорилирования. При патологической перестройке кардиомиоцитов наблюдается открытие МП. Это приводит к избыточному поступлению воды в митохондрии, их набуханию и разобщению процессов фосфорилирования, создавая условия для энергодефицита.

Целью настоящего исследования стало сопоставление морфологических изменений миокарда и выраженности митохондриальной дисфункции у гипертензивных крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Материалы и методы

В исследовании использовались спонтанно гипертензивные крысы-самцы линии SHR массой 220-300 г (n=20), а также нормотензивные крысы-самцы линии Вистар массой 220-270 г (n=10). Все манипуляции были проведены в соответствии с «Положениями про використання тварин у біомедичних дослідженнях», которые согласованы с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей». Крысы линии SHR предоставлены научно-исследовательской лабораторией кафедры фармакологии Национального медицинского университета имени А.А.Богомольца (зав. – членкор. НАН и НАМН Украины, профессор Чекман И.С.). Все исследования проведены на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Запорожского государственного медицинского университета (зав. – профессор Абрамов А.В.).

Первая группа состояла из 10 интактных спонтанно гипертензивных крыс. Вторая экспериментальная группа была представлена крысами линии SHR (n=10), которым моделировали сахарный диабет путем однократного внутривентрикулярного введения стрептозотоцина в дозе 50 мг/кг, разведенного *ex tempore* в 1 мл 0,1М цитратного буфера (рН 4,5) после 12-часового голодания. Далее каждое животное размещали в отдельной клетке при свободном доступе к воде и пище. В течение первых суток эксперимента крысам выпаивали 20%-ный раствор глюкозы, в течение вторых – 10%-ный. В третью группу были включены интактные нормотензивные крысы-самцы линии Вистар (n=10).

На 20-й день исследования у крыс всех групп измерялось систолическое артериальное давление (АД) методом плетизмографии при помощи прибора Transonic Animal Research Flowmeter T-106 Series («Transonic Systems Inc.», США). Измерение проводилось трижды с усреднением полученных результатов.

Для морфологических исследований на ротационном микроскопе MICROM HR-325 («Microm», Германия) готовили 5-микронные серийные поперечные срезы из различных участков левого желудочка крыс, фиксированного по Буэну, которые затем депарафинировали в ксилоле, проводили регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%), отмывали в физиологическом растворе и окрашивали галогенин-хромовыми квасцами по Эйнарсону. В каждой серии исследованию подвергали около 500 участков из различных частей миокарда. Изучение морфометрических и денситометрических характеристик проводили на компьютерной системе цифрового анализа изображения VIDAS-386 («Kontron Elektronik», Германия). Изображение, получаемое на микроскопе AXIOSKOP, с помощью высокочувствительной видеокамеры

СОНУ-4922 («СОНУ Inc.», США) вводилось в компьютерную систему цифрового анализа изображения и оцифровывалось по денситометрической шкале с 256 градациями серого цвета.

С помощью пакета прикладных программ VIDAS-2.5 («Kontron Elektronik», Германия) в автоматическом режиме определялись количество и площадь ядер миокардиоцитов, оптическая плотность ядер, связанная с концентрацией в них РНК, площадь и оптическая плотность цитоплазмы кардиомиоцитов. Расчетными параметрами являлись удельное количество (плотность) ядер кардиомиоцитов (мм^{-2}), ядерно-цитоплазматический коэффициент, концентрация РНК в ядрах и цитоплазме кардиомиоцитов (единиц оптической плотности, $E_{\text{оп}}$), рассчитанных по формуле $GREY_i = |\lg(D_i / D_0)|$, где D_i - показатели оптической плотности ядра или цитоплазмы, а D_0 - показатель оптической плотности межклеточного вещества. Ядерно-цитоплазматический коэффициент определяли как соотношение ядер к площади цитоплазмы кардиомиоцитов анализируемой области.

В качестве маркера системной митохондриальной дисфункции нами был изучен процесс открытия гигантских МП, выделенных из ткани сердца экспериментальных животных (Акопова О.В., Сагач В.Ф., 2004). Для этого фрагмент миокарда крыс тщательно промывали охлажденным 0,9%-ным раствором КСl (3-4°C), измельчали и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды (в ммоль): сахарозы – 250, трис-НСl-буфера – 20, ЭДТА -1 (рН 7,4). Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования при температуре 4°C. Сначала гомогенат центрифугировали 7 минут при 700g для осаждения клеточных фрагментов. Затем супернатант центрифугировали повторно 15 минут при 11000 g. Полученный осадок митохондрий суспендировали в небольшом объеме среды выделения (но без ЭДТА) и сохраняли во льду при температуре

от 0 °С до +1 °С. Для регистрации открытия МП в инкубационную смесь, которая состояла из 120 ммоль КСl, 0,5 ммоль $\text{KН}_2\text{PО}_4$, 2 ммоль глутамата, 1 ммоль малата, 20 ммоль трис-НСl-буфера (рН 7,4), вносили суспензию митохондрий. Изменения барьерной функции митохондриальных мембран определяли спектрофотометрически, как снижение светопоглощения при 540 нм, вызванное набуханием митохондрий. Процесс индуцировали внесением в инкубационную среду 50 мкмоль Ca^{2+} . Открытие МП сопровождалось набуханием митохондрий и выходом Ca^{2+} во внемитохондриальное пространство после Ca^{2+} -перегрузки органелл. Снижение оптической плотности (ΔE) в исследуемых образцах характеризовало интенсивность процесса. Все спектрофотометрические исследования выполнялись на приборе Libra S32 PC («Biochrom Ltd.», Англия).

Статистическую обработку данных производили с помощью пакета программ Statistica 6.0 («StatSoft», США, № лицензии АХХR712D833214FAN5). Сравнительный анализ в группах проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием критерия Ньюмена-Кейлса для множественных сравнений. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Уровень АД у нормотензивных крыс составил 126 ± 3 мм рт.ст., а у крыс линии SHR – 155 ± 5 мм рт.ст. ($p < 0,05$). При морфометрическом анализе миокарда у крыс со спонтанной гипертензией отмечалось достоверное снижение ядерно-цитоплазматического коэффициента и плотности ядер по сравнению с нормотензивными животными, что косвенно отражает наличие у них патологической гипертрофии (табл. 1). Также наблюдали снижение площади ядер кардиомиоцитов с параллельным уменьшением в них концентрации РНК.

Таблица 1

Морфометрические и денситометрические характеристики миокарда экспериментальных животных ($M \pm m$)

Группы	Площадь ядра кардиомиоцита, мкм^2	Концентрация РНК в ядрах кардиомиоцитов, $E_{\text{оп}}$	Концентрация РНК в цитоплазме кардиомиоцитов, $E_{\text{оп}}$	Плотность ядер, мм^{-2}	Ядерно-цитоплазматический коэффициент
⁽¹⁾ SHR, интактные	$11,34 \pm 0,09$	$0,186 \pm 0,001$	$0,0892 \pm 0,0005$	2842 ± 38	$0,0318 \pm 0,0004$
⁽²⁾ SHR с СД	$13,02 \pm 0,16^{1,3}$	$0,184 \pm 0,001^3$	$0,0855 \pm 0,0005^{1,3}$	$2566 \pm 48^{1,3}$	$0,0333 \pm 0,0007^3$
⁽³⁾ Вистар, контроль	$12,59 \pm 0,08^{1,2}$	$0,231 \pm 0,001^{1,2}$	$0,0888 \pm 0,0008^{1,2}$	$4818 \pm 55^{1,2}$	$0,0603 \pm 0,0007^{1,2}$

Примечание: достоверность изменений $p < 0,05$ между группами сравнения указана цифрами.

У гипертензивных животных с экспериментальным сахарным диабетом площадь ядер кардиомиоцитов увеличивалась по сравнению с интактными животными линии Вистар и SHR. При

диомоцитов увеличивалась по сравнению с интактными животными линии Вистар и SHR. При

этом содержание РНК как в ядрах, так и цитоплазме было меньше у гипертензивных животных с сахарным диабетом, что отражает нарушение баланса процессов биосинтеза в миокарде. В этой группе отмечали наименьшую плотность ядер на 1 мм² ткани миокарда. Принимая во внимание важную роль РНК в процессе синтеза структурных и ферментных белков клеток, становится очевидной возможность подавления белоксинтетической функции кардиомиоцитов в условиях экспериментального СД.

Нарушение биосинтеза РНК у гипертензивных животных может служить отражением энергодиффицита. Как известно, промежуточные метаболиты системы оксидантного стресса инициируют каскад метаболических нарушений, в частности модулируют открытие гигантской МП (Rasola A. et al., 2010). Нами зарегистрировано увеличение скорости спонтанного открытия МП и набухания митохондрий миокарда SHR крыс, что свидетельствует об их повреждении (табл. 2).

Таблица 2
Регистрация степени открытия митохондриальной поры

Группа животных	ΔE^*
(1) SHR, интактные	0,146 ± 0,012
(2) SHR+СД	0,348 ± 0,01
(3) Вистар, контроль	0,018 ± 0,001
	$P_{1-2} < 0,05$
	$P_{1-3} < 0,05$
	$P_{2-3} < 0,05$

Примечание: * ΔE – изменение оптической плотности суспензии митохондрий после воздействия цитотоксических агентов.

Наиболее выраженные нарушения наблюдались в миокарде крыс линии SHR с сахарным диабетом. Показатель, характеризующий набухание митохондрий, повышается у крыс со спонтанной артериальной гипертензией, а также у SHR крыс с сахарным диабетом, соответственно в 8,1 и 19,3 раза (по сравнению с нормотензивными животными). Одной из причин открытия МП считается кальциевая перегрузка вследствие

избыточно поступающего в митохондрии цитозольного кальция (Будников Е.Ю. и соавт., 2005). Функциональные нарушения митохондрий заключаются в повышении проницаемости их мембраны для малых молекул. Индукторами пермеабилзации митохондриальной мембраны могут выступать также активные формы кислорода, продукты перекисного окисления липидов. Это приводит к набуханию матрикса, разрыву наружной мембраны и выходу в цитозоль проапоптотических факторов. При артериальной гипертензии нарушается функционирование клеточных мембран митохондрий, приводящее к нарушению кальциевого транспорта, что особенно манифестно проявляется в условиях экспериментального сахарного диабета.

Выводы

1. Морфологические изменения кардиомиоцитов у гипертензивных крыс с экспериментальным сахарным диабетом характеризуются снижением количества ядер на единицу площади и низким ядерно-цитоплазматическим коэффициентом по сравнению с интактными гипертензивными животными.

2. У спонтанно гипертензивных крыс с сахарным диабетом регистрируется снижение биосинтеза РНК в ядре и цитоплазме кардиомиоцитов на фоне увеличенной площади ядер по сравнению с интактными животными.

3. У спонтанно гипертензивных крыс регистрируются признаки митохондриальной дисфункции в виде повышенной проницаемости мембраны по сравнению с нормотензивными животными. При экспериментальном сахарном диабете степень открытия митохондриальной поры прогрессивно увеличивается.

4. Нарушение процессов биосинтеза РНК в ядре и цитоплазме кардиомиоцитов гипертензивных крыс с сахарным диабетом ассоциируется с выраженностью митохондриальной дисфункции.

Перспективы дальнейших разработок

Планируется изучить экспрессию маркеров апоптоза в кардиомиоцитах спонтанно гипертензивных крыс на фоне экспериментального сахарного диабета при развитии митохондриальной дисфункции.

Список литературы

Акопова О. В. Индукция открытия митохондриальной поры под действием Ca^{2+} в миокарде крыс / О. В. Акопова, В. Ф. Сагач // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 76, № 1. – С. 48-55.

Акопова О. В. Роль митохондриальной поры в трансмембранном обмене кальция в митохондриях / О. В. Акопова // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 3. – С. 40-47.

Гавриш А. С. Морфогенез гипертрофии

сердца при хронической коронарной недостаточности/ А. С. Гавриш // Укр. кардиол. журн. – 2005. – № 5. – С. 100-106.

Дорошук А. Д. Структурно-функциональные особенности митохондрий при экспериментальной гипертензии различного генеза : дис. канд. биол. наук: спец. 03.00.04 «Биохимия» / Дорошук Александр Дмитриевич. – Москва : [б.изд.]; 2007. – 127 с.

Мойбенко А. А. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / А. А. Мойбенко, В. Е. Досенко, А. Н. Пархоменко. – К. : Наукова думка, 2008. – 520 с.

Особенности кальций-индуцируемого выхода кальция из митохондрий печени спонтанно-гипертензивных крыс / Е. Ю. Будников [и др.] // Кардиология. – 2005. – Т. 45, №7. – С. 49-53.

Особенности функционирования митохондрий миокарда у крыс со спонтанной гипертензией (SHR) на фоне экспериментального сахарного диабета и атеросклероза / М. Ю. Колесник, И. Ф. Беленичев, Г. В. Дзяк [и др.] // Запорожский ме-

дицинский журнал. – 2012. - № 2. – С. 26-31.

Постнов Ю. В. Недостаточность образования АТФ в связи с кальциевой перегрузкой митохондрий как источник повышения артериального давления при первичной гипертензии / Ю. В. Постнов // Кардиология. – 2005. - № 10. – С. 4-11.

Gustaffson A. Heart mitochondria: gates of life and death / A. Gustaffson, R. Gottlieb // Cardiovasc. Res. – 2008. – Vol. 77. – P. 334-343.

Signal transduction to the permeability transition pore / A. Rasola [et al.] // FEBS Lett. – 2010. – Vol. 584, № 10. – P. 1989-1996.

Колесник М.Ю. Морфологічні зміни кардіоміоцитів за розвитку мітохондріальної дисфункції у спонтанно гіпертензивних щурів на фоні експериментального цукрового діабету.

Резюме. Концепція енергетичного дефіциту в патогенезі артеріальної гіпертензії та цукрового діабету відкриває нові перспективи щодо розуміння молекулярно-біохімічних механізмів цих захворювань. Проведене зіставлення морфологічних змін кардіоміоцитів та ступеня мітохондріальної дисфункції у спонтанно гіпертензивних щурів з експериментальним цукровим діабетом. Стан мітохондрій оцінювали шляхом дослідження проникності гігантської мітохондріальної пори. Встановлено, що у спонтанно гіпертензивних щурів достовірно підвищується проникність мітохондріальної пори. За розвитку експериментального цукрового діабету реєструється ще значніше збільшення проникності мембрани мітохондрій. При цьому спостерігається збільшення площі ядер кардіоміоцитів та зниження ядерно-цитоплазматичного коефіцієнта у діабетичних тварин. Продемонстровано, що концентрація РНК у ядрах та цитоплазмі кардіоміоцитів достовірно знижується порівняно з інтактними гіпертензивними тваринами. Порушення біосинтезу РНК у міокарді гіпертензивних щурів із експериментальним цукровим діабетом асоціюється із важкістю мітохондріальної дисфункції.

Ключові слова: кардіоміоцити, спонтанно гіпертензивні щури, мітохондрії, цукровий діабет, морфологічні зміни.