

УДК 577.24

МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИЙ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ СТАРЕНИИ

© 2015 Ч.М. Эльдаров^{1,3}, В.Б. Вайс^{1,3}, И.М. Вангели^{1,3},
Н.Г. Колосова², Л.Е. Бакеева^{1,3*}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва;
факс: +7(495)939-3181, электронная почта: fhb@belozersky.msu.ru,
bakeeva@belozersky.msu.ru

² Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск,
пр. Академика Лаврентьева, 10; факс: +7(383)333-1278

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ Митохондриологии, 119991 Москва; факс: +7(495)939-5945,
электронная почта: info@mitotech.ru

Поступила в редакцию 17.12.14
После доработки 28.01.15

Разработанный нами новый метод морфометрического анализа митохондрий использован для изучения состояния ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов крыс Wistar и OXYS в возрасте 3 и 24 мес. Полученные результаты полностью подтверждают данные электронно-микроскопических наблюдений: выявлено значительное снижение с возрастом площади внутренней мембраны митохондрии на единицу объема митохондрии на срезе сердечной мышцы крыс. Контрольное значение этого показателя для крыс Wistar в возрасте 3 мес. составило $41,3 \pm 1,52$ мкм²/мкм³. Для крыс OXYS в возрасте 3 мес. данный показатель оказался сниженным и составил $30,57 \pm 1,74$ мкм²/мкм³. С возрастом площадь внутренней мембраны на единицу объема митохондрий у обеих групп животных снижалась – с $41,3 \pm 1,52$ до $21,47 \pm 1,22$ мкм²/мкм³ у Wistar и с $30,57 \pm 1,74$ до $16,3 \pm 0,89$ мкм²/мкм³ у OXYS. Разработанный и использованный нами метод морфометрического анализа значительно упрощает процесс морфометрических измерений, открывая хорошие возможности для его дальнейшей оптимизации с использованием технологий распознавания изображений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: морфометрия, старение, ультраструктура, кардиомиоциты.

В настоящее время все большее внимание уделяется исследованиям процессов, связанных со старением, в т.ч. возраст-зависимых изменений органов и тканей. Одно из ведущих направлений – изучение возрастных изменений миокарда, поскольку болезни сердца входят в число главных причин смертности населения. По данным Всемирной организации здравоохранения доля сердечно-сосудистых заболеваний в числе патологий, развивающихся с возрастом, неуклонно растет с каждым годом [1].

На основании свободнорадикальной теории Хармана [2] была сформулирована митохондриальная теория старения, расширенная затем В.П. Скулачевым. Согласно этой теории главным фактором развития возрастных изменений органов и тканей является изменение функционального состояния митохондрий вследствие образования этими органеллами избыточного количества активных форм кислорода (АФК)

[3–7]. Вызываемый АФК окислительный стресс играет центральную роль в процессе нормального физиологического старения, а также этиологии множества серьезных патологий миокарда [8–15]. Хорошо известна связь функционального состояния митохондрий с изменениями их ультраструктуры [16–20]. Поэтому исследования морфологических изменений митохондрий, обусловленных возрастом, чрезвычайно перспективны, поскольку нарушения ультраструктуры митохондрий возникают значительно раньше, нежели появление выявляемых клинически симптомов заболеваний. В то же время характерная ультраструктура митохондрий указывает на изменения функционального состояния ткани и, как следствие, на начало развития патологических процессов.

При проведении исследований по ультраструктуре митохондрий важную роль играет не только качественная, но и количественная оценка получаемых данных с помощью методов морфометрического и стереологического ана-

* Адресат для корреспонденции.

лиза ультраструктуры митохондрий. Общепринятым подходом является измерение длины и ширины этих органелл, общей и средней площади сечения отдельных митохондрий, объемной доли митохондрий в объеме среза, а также площади внутренней мембраны на единицу объема митохондрий [21, 22]. Основным является метод наложения на изображение различных систем точек, отрезков, концентрических дуг и окружностей с последующим подсчетом числа точек, попавших на структуры, или количества пересечений тестовых линий [23–25]. Данные методы отличаются высокой трудоемкостью и необходимостью проведения большого количества измерений, что требует значительных затрат времени для этих подсчетов. Использование компьютерных программ для анализа данных электронной микроскопии – распознавания и обработки изображений – позволяет упростить и сократить количество измерений, необходимых для оценки морфометрических параметров митохондрий и, в частности, расчета площади внутренней мембраны митохондрии на единицу объема митохондрии – одного из наиболее важных морфометрических параметров, позволяющего оценить функциональное состояние митохондрий. Применение компьютерных графических пакетов открывает возможности для дальнейшей автоматизации процесса анализа электронно-микроскопических фотографий.

Целью данной работы являлось применение предложенного нами метода морфометрического анализа митохондрий в автоматическом и полуавтоматическом режимах для анализа результатов электронно-микроскопического исследования. Предложенный метод мы использовали для морфометрической обработки выявленных нами ультраструктурных изменений митохондрий кардиомиоцитов крыс Wistar и OXYS при старении. Линия крыс OXYS является уникальной моделью для исследования роли окислительного стресса в развитии возраст-зависимых патологий. Животных этой линии отличают ранние инволютивные изменения внутренних органов и нарушения функций высшей нервной деятельности, характерные для стареющих животных и человека. Ключевой характеристикой крыс OXYS является усиленная генерация радикалов кислорода, выявляемая в тканях животных [26].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Модель преждевременно стареющих крыс OXYS была выведена в Институте цитологии и генетики Сибирского отделения РАН

из линии Wistar путем отбора крыс, наиболее восприимчивых к катарактогенному эффекту галактозной диеты, и их близкородственного скрещивания [27, 28]. Линия зарегистрирована в международной базе данных Rat Genome (<http://rgd.mcw.edu>). К настоящему моменту имеется 99-е поколение OXYS с синдромом ускоренного старения.

Работа выполнена на крысах-самцах Wistar ($n = 15$) и OXYS ($n = 15$) в возрасте 24 мес., полученных из Центра коллективного пользования «Генофонды экспериментальных животных» ИЦиГ СО РАН. Животных содержали группами по пять особей при естественном освещении, температуре $22 \pm 2^\circ$ и свободном доступе к воде и корму (ПК-120-1, «Лабораторснаб», Россия). В качестве контроля для оценки возрастных изменений ткани миокарда было использовано по пять крыс Wistar и OXYS в возрасте 3 мес.

Все процедуры, выполненные на животных, проводились в соответствии с Директивой Совета Европейского союза № 86/609/EES.

Электронная микроскопия. Для электронно-микроскопического исследования забирали ткань стенки левого желудочка. Материал фиксировали 3%-ным раствором глutarового альдегида в фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 2 ч при 4° , затем дофиксировали 1%-ным раствором четырехоксида осмия в буфере в течение 1,5 ч и обезвоживали в растворах спиртов с возрастающей концентрацией спирта (70%-ный спирт был насыщен уранилацетатом). Материал заливали в эпоксидную смолу Эпон-812. Серийные ультратонкие срезы делали на ультрамикротоме «Leica» (Германия), окрашивали свинцом по Рейнольдсу. Полученные препараты просматривали и фотографировали в электронном микроскопе H-12 («Hitachi», Япония). Фотографии на пленке затем были отсканированы с разрешением 1200 и 2400 dpi.

Морфометрия и статистический анализ. Для морфометрического исследования было отобрано по 50 электронно-микроскопических фотографий миокарда на каждую группу животных. Каждый снимок сканировался с определенным разрешением (dpi), что позволило вычислить масштаб каждого снимка – количество пикселей фотографии на единицу реальной длины (1 нм) – по формуле:

$$K_{\text{pix/nm}} = M \times R_s / 25,4 \times 10^6, \quad (1)$$

где M – увеличение микроскопа, R_s – разрешение сканирования.

На каждом снимке вручную выделялись отдельные митохондрии, затем внутри каждой митохондрии выделялась внутренняя мембрана

(рис. 1, *a–в*; см. цветную вклейку). Ширина линии при выделении мембран выбиралась согласно значению k (пикс/нм), вычисленному по формуле (1), принимая среднюю ширину внутренней мембраны митохондрии на снимке равной 75 \AA (рис. 1, *a–в*). Учитывая масштаб снимка, а также известную толщину среза порядка 700 \AA , с помощью пакета анализа данных в Adobe Photoshop («Adobe Systems, Inc.», США) были вычислены различные морфометрические параметры, такие как площадь внутренней мембраны митохондрии в объеме среза, общая длина внутренней мембраны митохондрии и объем митохондрии в срезе. При этом использовалось допущение о том, что измеряемые мембраны строго перпендикулярны плоскости среза. Неперпендикулярные мембраны будут просто не видны на снимке, погрешность при использовании этого допущения не превышает 4%. С помощью полученных данных была рассчитана площадь поверхности внутренней мембраны (мкм^2) на единицу объема митохондрии (мкм^3). Для статистической обработки морфометрических данных использовался пакет STATISTICA 8 («StatSoft Inc.», США). Степень достоверности определялась с помощью критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2, *a* представлена характерная картина ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов крыс Wistar в возрасте 3 мес. Ультраструктура митохондрий соответствует функционально-активному ортодоксальному состоянию по классификации Грина [29]. Внутренняя митохондриальная мембрана образует множественные кристы, отходящие внутрь органеллы плотными параллельными рядами, заполняющими все внутреннее пространство митохондрий. Матрикс хорошо выраженный, межмембранное пространство (узкие просветы внутри крист и между наружной и внутренней митохондриальной мембранами) электронно-светлое. На рис. 2, *б* представлена картина ультраструктуры митохондрий, характерная для кардиомиоцитов крыс Wistar в возрасте 24 мес. Видно, что с возрастом у крыс Wistar происходит значительное изменение внутренней ультраструктуры митохондрий. Кристы, число которых сильно редуцировано, теряют строго взаимно-параллельное расположение и не заполняют полностью внутреннее пространство митохондрий, вследствие чего в матриксе митохондрий появляются обширные электронно-светлые области. На фотографии видно, что часть крист, еще сохранивших взаимопарал-

лельное расположение, формирует изгибающийся тяж, свободно лежащий в электронно-светлом матриксе.

Для морфометрической оценки состояния ультраструктуры митохондрий и ответа на вопрос, не являются ли обнаруженные нами возрастные изменения ультраструктуры митохондрий единичными, был проведен морфометрический анализ по 50 электронно-микроскопическим фотографиям кардиомиоцитов на каждую группу животных. На рис. 3 представлены результаты измерения площади поверхности внутренней мембраны в единице объема митохондрий для крыс Wistar. Для митохондрий в возрасте 3 мес. этот показатель составил $41,3 \pm 1,52 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$. Для крыс в возрасте 24 мес. мы получили практически двукратное статистически достоверное снижение средних значений площади внутренней мембраны в единице объема митохондрий, до $21,47 \pm 1,22 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$.

На рис. 4, *a* представлена типичная ультраструктура митохондрий кардиомиоцитов крыс OXYS в возрасте 3 мес. Можно видеть, что уже в этом возрасте в митохондриях крыс OXYS начинают развиваться деструктивные изменения. Появляются первые признаки нарушения внутренней организации. В отдельных участках органелл кристы теряют плотное взаимопараллельное расположение, в митохондриях появля-

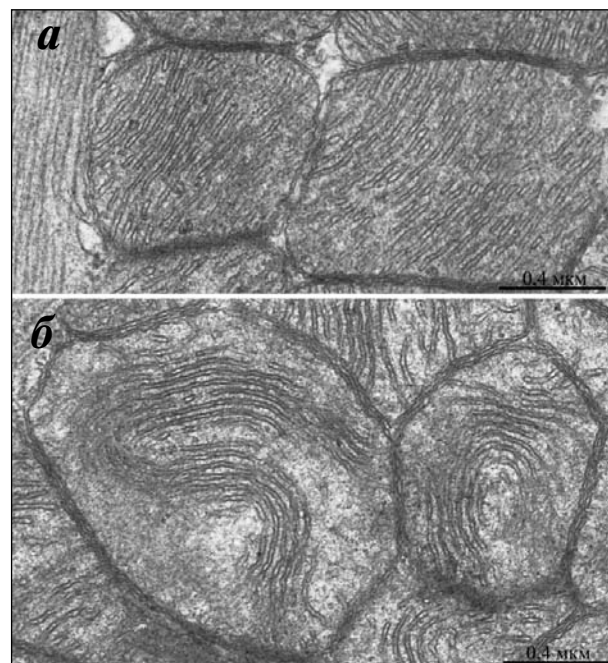


Рис. 2. Ультраструктура митохондрий кардиомиоцитов крыс Wistar: *a* – в возрасте 3 мес., *б* – в возрасте 24 мес.

ются электронно-светлые участки. Ультраструктура митохондрий крыс OXYS в возрасте 3 мес. имеет ту же направленность изменений, как и у крыс Wistar в возрасте 24 мес. На рис. 4, б представлена электронно-микроскопическая фотография митохондрий ткани миокарда крысы OXYS в возрасте 24 мес. Видны значительные нарушения внутренней ультраструктуры митохондрий. Внутренняя мембрана митохондрий образует немногочисленные кристы, упорядочен-

ность расположения крист сохраняется только в отдельных участках митохондрии. Наблюдается значительное просветление матрикса. Большую часть матрикса митохондрий занимают электронно-светлые области.

Для животных OXYS также был проведен морфометрический анализ электронно-микроскопических данных и рассчитана площадь внутренней мембраны на единицу объема митохондрий (рис 3). Оказалось, что митохондрии крыс OXYS уже в возрасте 3 мес. имеют заметно меньшие значения данного параметра по сравнению с 3-месячными животными линии Wistar ($30,57 \pm 1,74$ и $41,3 \pm 1,52$ $\mu\text{м}^2/\mu\text{м}^3$ соответственно). К 24 мес. у крыс OXYS среднее значение площади внутренней мембраны на единицу объема митохондрии также падает практически вдвое, аналогично показателям для крыс Wistar (с $30,57 \pm 1,74$ до $16,3 \pm 0,89$ $\mu\text{м}^2/\mu\text{м}^3$).

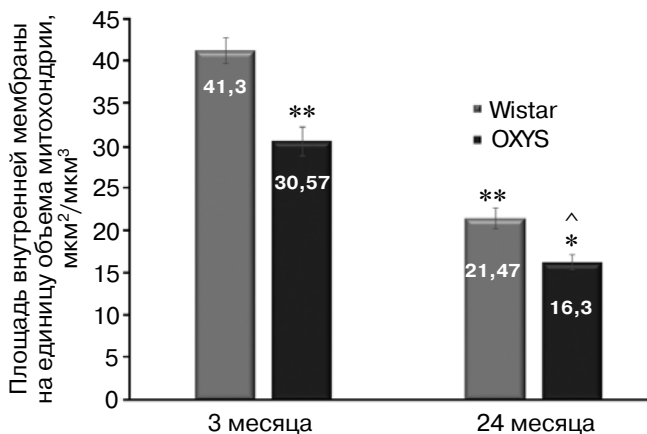


Рис. 3. Средние значения площади внутренней мембраны на единицу объема митохондрий кардиомиоцитов у крыс Wistar и OXYS при старении, * $p < 0,01$ против OXYS 3 мес.; ** $p < 0,01$ против Wistar 3 мес.; ^ $p < 0,01$ против Wistar 24 мес. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наши исследования позволяют сделать вывод о результативности предложенного нами метода морфометрического анализа ультраструктуры митохондрий. Проведенный морфометрический анализ данных не только полностью подтверждает, но и дополняет электронно-микроскопические наблюдения по морфологии митохондрий, показывая характер изменений ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов при старении. Полученные значения площади внутренней мембраны митохондрий на единицу объема митохондрий полностью соответствуют данным визуальных наблюдений и позволяют оценить степень ультраструктурных нарушений митохондрий. Так, у крыс Wistar и OXYS с возрастом происходит значительное снижение данного морфометрического параметра (рис. 3), что может свидетельствовать о дисфункции митохондрий и миокарда в целом. Если контрольное значение для крыс Wistar в возрасте 3 мес. составляет $41,3 \pm 1,52$ $\mu\text{м}^2/\mu\text{м}^3$, то для крыс OXYS того же возраста показатель площади внутренней мембраны на единицу объема митохондрии снижен почти на четверть и составляет $30,57 \pm 1,74$ $\mu\text{м}^2/\mu\text{м}^3$. Следует отметить, что с возрастом эти параметры для обеих групп животных снижаются примерно одинаково – вдвое от исходного значения – с $41,3 \pm 1,52$ до $21,47 \pm 1,22$ $\mu\text{м}^2/\mu\text{м}^3$ у Wistar и с $30,57 \pm 1,74$ до $16,3 \pm 0,89$ $\mu\text{м}^2/\mu\text{м}^3$ у OXYS. Однако у крыс OXYS значения площади внутренней мембраны на единицу объема митохондрий значительно снижены по сравнению с кардиомиоцитами крыс контрольной группы Wistar ($16,3 \pm 0,89$ и

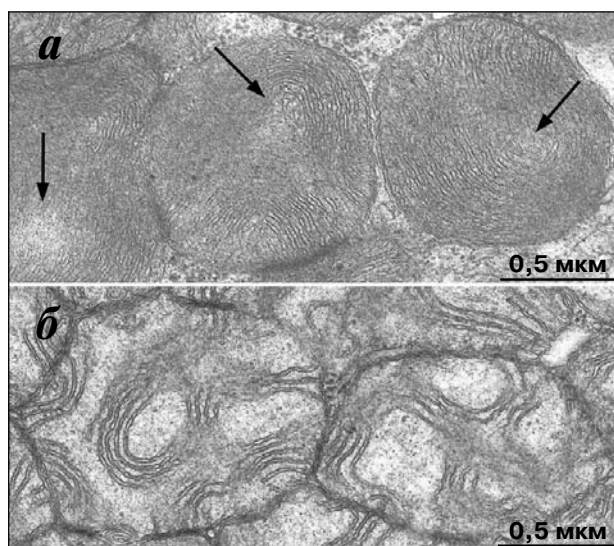


Рис. 4. Внутренняя ультраструктура митохондрий кардиомиоцитов крыс OXYS: а – в возрасте 3 мес., стрелками показаны электронно-светлые участки; б – в возрасте 24 мес.

21,47 ± 1,22 мкм²/мкм³ соответственно). Таким образом, как данные визуальных наблюдений, так и морфометрический анализ ультраструктуры митохондрий показывают, что у крыс OXYS возрастные изменения ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов возникают значительно раньше, чем у контрольных крыс Wistar, и с возрастом более выражены.

В литературе для измерения различных морфометрических параметров клеток и тканей в большинстве случаев применялись и применяются системы точек и тестовых линий, предложенные еще А.А. Глаголевым [30] и впоследствии описанные Вейбелем [23]. Доля точек, попавших на профили структур, а также число пересечений с тестовыми линиями определяют относительный объем, площадь, среднюю длину, ширину органелл и другие параметры. В частности, такой метод применялся для исследования миокарда сирийских хомячков при старении [31]. В этой работе было показано, что с возрастом происходит значительное снижение объема саркоплазматического ретикулума при одновременном увеличении количества жировых капель. Также снижались и средние значения площади поверхности внутренней мембраны на единицу объема митохондрии. Френзелем и Фейманом было выявлено снижение объемной доли митохондрий в левом и правом желудочках сердца у 2-летних крыс Wistar по сравнению с 6-недельным контролем. Средний размер митохондрий уменьшался, соответственно, на 36 и 11% для левого и правого желудочков [32].

Для морфометрии кардиомиоцитов также применялись и другие методы, такие как подсчет профилей структур вручную на электронно-микроскопических снимках, а также анализ изображений с помощью специально разработанного программного обеспечения. Анализ

изображений в этих методах был также основан на базовом методе подсчета точек и отрезков [33, 34]. Вышеперечисленные методы зачастую требуют разработки специальных тест-систем, лучше всего удовлетворяющих условиям конкретного исследования. Возможно, этим объясняется тот факт, что в исследованиях подобного рода уделяется внимание в основном оценке состояния ткани в целом либо динамике изменений количества миофибрилл, при этом морфометрия внутренней организации митохондрий кардиомиоцитов изучена мало, поскольку использование систем из точек и отрезков для анализа внутренней организации митохондрий не может дать точную, объективную и статистически достоверную оценку состояния ультраструктуры митохондрий. Мы попробовали полностью отказаться от общепринятого использования систем точек и отрезков. Результаты, полученные в предварительных исследованиях при разработке данного метода, показали эффективность нашего подхода [35]. Используемый нами в настоящее время метод значительно упрощает процесс морфометрических измерений, открывает хорошие возможности для его дальнейшей оптимизации с привлечением технологий распознавания изображений. По нашему мнению, применение морфометрических методов исследования в сочетании с гистологическими и биохимическими методами чрезвычайно перспективно не только для выявления и понимания корреляции между параметрами ультраструктуры митохондрий и их функциональным состоянием, но и для оценки функционального состояния ткани в целом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *10 ведущих причин смертности в мире* (2014) Всемирная организация здравоохранения, информационный бюллетень № 310. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
2. Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, **11**, 298–300.
3. Harman, D. (1972) The biologic clock: the mitochondria, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **20**, 145–147.
4. Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., and Johnson, J.E. (1980) Mitochondrial role in cell aging, *Exp. Gerontol.*, **15**, 575–591.
5. Скулачев В.П. (1997) Старение организма – особая биологическая функция, а не результат поломки сложной живой системы: биохимическое обоснование гипотезы Вейсмана, *Биохимия*, **62**, 1394–1399.
6. Скулачев В.П. (1999) Феноптоз: запрограммированная смерть организма, *Биохимия*, **64**, 1679–1688.
7. Скулачев В.П. (2001) Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода, *Соросовский образовательный журнал*, **7**, 4–10.
8. Lenaz, G. (2001) The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology, *IUBMB Life*, **52**, 159–164.
9. Андреев А.Ю., Кушнарева Ю.Е., Старков А.А. (2005) Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях, *Биохимия*, **70**, 246–264.
10. Honda, H.M., Korge, P., and Weiss, J.N. (2005) Mitochondria and ischemia/reperfusion injury, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1047**, 248–258.

11. Zweier, J.L., and Talukder, M.A. (2006) The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury, *Cardiovasc. Res.*, **70**, 181–190.
12. Yellon, D.M., and Hausenloy, D.J. (2007) Myocardial reperfusion injury, *N. Engl. J. Med.*, **357**, 1121–1135.
13. Eltzschig, H.K., and Eckle, T. (2011) Ischemia and reperfusion – from mechanism to translation, *Nature Med.*, **17**, 1391–1401.
14. Borutaite, V., Toleikis, A., and Brown, G.C. (2013) In the eye of the storm: mitochondrial damage during heart and brain ischaemia, *FEBS J.*, **280**, 4999–5014.
15. Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Aksentijevic, D., Sundier, S.Y., Robb, E.L., Logan, A., Nadochiy, S.M., Ord, E.N., Smith, A.C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.H., Dare, A.J., James, A.M., Rogatti, S., Hartley, R.C., Eaton, S., Costa, A.S., Brookes, P.S., Davidson, S.M., Duchon, M.R., Saeb-Parsy, K., Shattock, M.J., Robinson, A.J., Work, L.M., Frezza, C., Krieg, T., and Murphy, M.P. (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS, *Nature*, **515**, 431–435.
16. Hackenbrock, C.R. (1966) Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria, *J. Cell Biol.*, **30**, 269–297.
17. Hackenbrock, C.R. (1968) Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 598–605.
18. Green, D.E., Asai, J., and Harris, R.A. (1968) Conformational basis of energy transformations in membrane systems. III. Configurational changes in the mitochondrial inner membrane induced by changes in functional states, *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 684–705.
19. Бакеева Л.Е., Северина И.И., Скулачев В.П., Ченцов Ю.С., Ясайтис А.А. (1971) Проникающие ионы и структура митохондрий. В сб. *Митохондрии. Структура и функции в норме и патологии*. Наука, Москва, с. 67.
20. Бакеева Л.Е., Ясайтис А.А. (1972) Изменения структуры митохондрии в ответ на функциональные воздействия. В кн. *Митохондрии. Молекулярные механизмы ферментативных реакций*, Наука, Москва, с. 56–64.
21. McCallister, B.D., and Brown, A.L. (1965) A quantitative morphological study of the mitochondria in experimental cardiac hypertrophy, *Lab. Invest.*, **14**, 692–700.
22. Cieciora, L., Ryzdzynski, K., and Klitonczyk, W. (1979) Stereologic studies on mitochondrial configuration in different organs of the rat, *Cell Tissue Res.*, **196**, 347–360.
23. Weibel, E.R. (1979) *Stereological methods. Vol. 1. Practical methods for biological morphometry*, Academic Press, London.
24. Gundersen, H.J., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sorensen, F.B., and Vesterby, A. (1989) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis, *APMIS*, **96**, 37–394.
25. Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2003) Stereological tools in biomedical research, *An. Acad. Bras. Cienc.*, **75**, 469–486.
26. Zhdankina, A.A., Fursova, A.Z., Logvinov, S.V., and Kolosova, N.G. (2008) Clinical and morphological characteristics of chorioretinal degeneration in early aging OXYS rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **146**, 455–458.
27. Соловьева Н.А., Морозкова Т.С., Салганик Р.И. (1975) Получение сублинии крыс с признаками наследственной галактоземии и исследование их биохимических особенностей, *Генетика*, **18**, 63–71.
28. Румянцева Ю.В., Фурсова А.Ж., Федосеева Л.А., Колосова Н.Г. (2008) Изменения физико-химических характеристик и экспрессии генов α -кристаллинов в хрусталиках крыс OXYS при развитии катаракты, *Биохимия*, **73**, 1467–1475.
29. Green, D.E., and Baum, H. (1970) *Energy and the mitochondrion*, Academic Press, N.Y., London.
30. Глаголев А.А. (1941) *Геометрические методы количественного анализа агрегатов под микроскопом*, Гостеоиздат, Москва.
31. Sachs, H.G., Colgan, J.A., and Lazarus, M.L. (1977) Ultrastructure of the aging myocardium: a morphometric approach, *Am. J. Anat.*, **150**, 63–71.
32. Frenzel, H., and Feimann, J. (1984) Age-dependent structural changes in the myocardium of rats. A quantitative light- and electron-microscopic study on the right and left chamber wall, *Mech. Ageing Dev.*, **27**, 29–41.
33. Zacharova, G., and Kubinova, L. (1995) Stereological methods based on point counting and unbiased counting frames for two-dimensional measurements in muscles: comparison with manual and image analysis methods, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **16**, 295–302.
34. Tang, Y., Nyengaard, J.R., Andersen, J.B., Baandrup, U., and Gundersen, H.J. (2009) The application of stereological methods for estimating structural parameters in the human heart, *Anat. Rec. (Hoboken)*, **292**, 1630–1647.
35. Пилипенко Д.И. (2010) *Морфометрико-стереологический анализ ультраструктуры митохондрий при окислительном стрессе*. Автореферат дисс. канд. биол. наук, МГУ, Москва.

**MORPHOMETRIC STUDY OF MITOCHONDRIAL
ULTRASTRUCTURE IN AGING CARDIOMYOCYTES****C. M. Eldarov^{1,3}, V. B. Vays^{1,3}, I. M. Vangeli^{1,3},
N. G. Kolosova², L. E. Bakeeva^{1,3*}**

¹ *M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky
Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia;
fax: +7(495)939-0978, E-mail: fxb@genebee.msu.su,
bakeeva@belozersky.msu.ru*

² *Institute of cytology and genetics, Novosibirsk 630090, Russia,
pr. Lavrentieva 10; fax: +7(383)333-1278,
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru*

³ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Institute of Mitoengineering,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-5945,
E-mail: info@mitotech.ru*

Received December 17, 2014
Revision received January 28, 2015

Our morphometric study of mitochondrial ultrastructure in cardiomyocytes of the 3- and 24-month-old Wistar and OXYS rats fully confirms and supplements earlier electron-microscopic observations revealing significant decrease in ratio of inner membrane and mitochondrial volume during aging. Three-month-old OXYS rats have considerably lower ratio comparing to three-month-old Wistar rats – 30.57 ± 1.74 and $41.3 \pm 1.52 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ respectively. With age, almost two-fold decrease in mean ratio of inner membrane plus cristae to mitochondrial volume is shown for both Wistar and OXYS rats, but 24-month-old OXYS rats have 25% lower values than Wistar – 16.3 ± 0.89 and $21.47 \pm 1.22 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ respectively. A novel method of morphometry developed and used for this analysis facilitates morphometric measurements and suggests further improvement and optimization using image recognition algorithms.

Key words: morphometry, aging, ultrastructure, mitochondria, cardiomyocytes