

УДК (616.12+616-002.1):612.273.2

СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ МИОКАРДА КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ: РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АТФ-ЗАВИСИМОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА*

© 2015 Е.В. Розова¹, И.Н. Маньковская¹, Г.Д. Миронова^{2,3**}

¹ Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины,
Украина, 01024 Киев; факс: +7(380-044)256-2000,
электронная почта: erogova@ukr.net

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290 Пущино Московской обл.; факс: +7(4967)33-0553,
электронная почта: mironova40@mail.ru

³ Пущинский государственный естественно-научный институт,
142290 Пущино Московской обл.

Поступила в редакцию 01.07.14

После доработки 09.02.15

Исследованы изменения ультраструктуры и пространственной локализации митохондрий в миокарде при 30-мин гипоксической гипоксии. В этих условиях митохондрии изменяют свою структуру, однако выраженных некротических повреждений в них не обнаружено. При этом в миокарде появляются изменения, направленные на усиление энергетических процессов. Это выражается в увеличении количества митохондрий (МХ) в субсарколеммальной зоне гипоксического миокарда с изменением поверхности сублеммальной мембраны в виде ее изгибов вокруг митохондрий, что улучшает условия диффузии кислорода к митохондриям благодаря возрастанию площади диффузии. Усиливается также деление МХ, что способствует увеличению их количества. В структурно измененных митохондриях обнаруживаются небольшого диаметра электронно-плотные образования, представляющие собой вновь образующиеся органеллы – микроМХ – на различных стадиях структурной организации, что не наблюдается в миокарде при нормоксии. Выявлено, что одним из регуляторов морфологического состояния МХ при гипоксической гипоксии является АТФ-зависимый калиевый канал: активатор канала увеличивает количество вновь образованных микроМХ, а ингибитор предотвращает их образование. Обсуждаются возможные механизмы появления структурно-динамических изменений в митохондриальном аппарате миокарда крыс при острой гипоксической гипоксии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрия, гипоксическая гипоксия, ультраструктура, пространственная локали-

Изменения функционирования клеток при различных физиологических и патологических состояниях приводят к формированию в организме адаптивно-приспособительных или патологических реакций в ответ на эндо- и экзоген-

ные воздействия. Главным патогенетическим звеном при кислородном голодании тканей в организме является повреждение митохондрий (МХ), сопровождающееся нарушениями энергообеспечения и антиоксидантной защиты, а также стабильности мембран вследствие интенсификации образования продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1–6]. Экспериментальные исследования, проводимые в условиях гипоксии, позволили сделать вывод о том, что одними из первых органелл повреждаются МХ, являющиеся наиболее чувствительными к неблагоприятным воздействиям [7, 8]. МХ относятся к постоянно обновляющимся структурам клетки. Для нормального функционирования в условиях гипоксии МХ большое значение при-

Принятые сокращения: Г – острая гипоксическая гипоксия; МХ – митохондрии; 5HD – 5-гидроксидеканоат; ИМФ МХ – интрамиофибрилярная субпопуляция МХ; микроМХ – митохондрии; митоK_{АТФ} – митохондриальные АТФ-зависимые K⁺-каналы; СС МХ – субсарколеммальная субпопуляция МХ; S_{tot} – сумма поверхностей МХ в единице объема ткани.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, VM 14-188, 12.04.2015.

** Адресат для корреспонденции.

обретает их внутриклеточное распределение, определяемое взаимодействием со структурами цитоскелета [9–11].

Локализация МХ в клетке находится под контролем внешних и внутренних факторов и может изменяться при транспорте этих органелл вдоль микротрубочек и актиновых филаментов с помощью моторных белков [8–15]. В клетке МХ формируют высокодинамичный ретикулум, в котором происходят процессы постоянного ремоделирования. Качество МХ в тканях контролируется установлением баланса между удалением поврежденных МХ путем митофагии и генерацией новых полноценных органелл в результате их деления и активации биогенеза [7, 8, 11]. Окислительный стресс является, по литературным данным, одним из факторов, индуцирующих изменения динамического равновесия в митохондриальном аппарате клеток [4, 5, 13]. Изменения динамики МХ при продолжительном стрессе и острой тяжелой гипоксии различного генеза приводят к развитию митохондриальной дисфункции: снижается максимальная скорость дыхания, ADP-стимулируемое потребление кислорода, существенно снижаются активность креатинкиназы и уровень цитохрома *c*. Антиапоптотический белок Bcl-2 перемещается с внутренней мембраны митохондрий к наружной [4, 6, 10].

МХ миокарда имеют определенный характер локализации в клетке, существенный для функционирования такого энергозатратного органа как сердце. При изменении условий существования клетки элементы цитоскелета, обеспечивающие перемещение МХ в участки, где облегчена диффузия O₂, подвержены значительным модуляциям [10–12]. Механизм этого явления, наблюдаемого при различных эндо- и экзогенных воздействиях, пока не выяснен, хотя понимание его является важным шагом на пути к выяснению причин изменений энергетического метаболизма при этом.

Нарушения «правильного» распределения и транспорта митохондрий могут приводить к формированию ряда патологических состояний, в частности, к развитию тканевой гипоксии. При этом, одним из наиболее постоянных проявлений повреждения клеток при различных неблагоприятных воздействиях, включая недостаток кислорода, возникающий по разным причинам, является увеличение объема митохондрий – набухание. Помимо этого, МХ в экстремальных состояниях способны расти и делиться, достигая гигантских размеров, иногда больших, чем ядро, образуя мегамитохондрии [6–8, 16–17].

Недавно была выявлена специфическая форма изменений МХ кардиомиоцитов в усло-

виях *in vitro* при длительной (в течение 6–72 ч при температуре 20°) инкубации кусочков сердца в среде, лишенной O₂ [16]. При этом в структурно поврежденных органеллах выявляются микроМХ диаметром до 0,15 мкм [18, 19].

Показано, что образующиеся микроМХ полностью либо частично наследуют функции «родительских» митохондрий: в них, например, выявлен адекватный для нормальных МХ уровень активности цитохрома *c* [18]. Исследователи рассматривают данный процесс, как один из путей апоптотических изменений в МХ, что позволяет считать апоптоз двуединым процессом «саморазрушения-самосозидания» [18–21]. При этом механизмы, ответственные за подобные изменения ультраструктуры МХ, остаются невыясненными.

Известно, что митохондриальный АТР-зависимый калиевый канал (миток_{АТР}) участвует в защите сердца при ишемии, а также в процессах адаптации организма к гипоксии, и активаторы этого канала обладают кардиопротекторным действием [22–24]. Существование этого канала в митохондриях у многих исследователей не вызывает сомнения [см. обзоры 25, 26]. Однако, отсутствие достоверных данных о структуре канала не позволяло полностью быть уверенным в этом [27]. В последнее время появились работы об идентификации структуры миток_{АТР} канала. Установлено, что она близка к структуре цитоплазматического АТР-зависимого калиевого канала почек, так называемого ROMK (renal outer medullary potassium channel) канала, относящегося к семейству KIR (potassium inward rectified) каналов [28]. Кроме того, с помощью иммунохимического анализа с использованием электронной микроскопии доказана локализация KIR каналов в митохондриях [29].

В связи с вышесказанным, целью настоящей работы было изучение изменений пространственного расположения и ультраструктуры митохондрий в кардиомиоцитах при воздействии на животных *in vivo* острой 30-мин гипоксической гипоксии. Установлено, что такая гипоксия способствует появлению изменений в ультраструктуре митохондрий, направленных на усиление энергетических процессов, т.е. на адаптацию животных. Показано, что миток_{АТР} канал участвует в формировании этих изменений в структуре МХ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты. Глютаровый альдегид, уранилацетат, цитрат свинца – все реактивы фирмы «Sigma» (США); эпон-аралдит – фирма «Fluka»

(Швейцария); diazoxide и 5-гидроксидеканоат (5HD) – фирма «Schering AG» (США).

Исследование проведено на 34 половозрелых белых лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой 220–300 г. Контрольная группа животных составляла 8 особей.

Гипоксическую гипоксию создавали в герметичной камере объемом 10 л с находящимся в ней животным с помощью газовой смеси, содержащей 7% кислорода в азоте, с поглощением выделяемого крысами CO_2 прокаленной натронной известью. Животные находились в камере в течение 30 мин. Достижимое при этом снижение концентрации кислорода во вдыхаемом животным воздухе дало возможность определить границы приспособительных возможностей организма на тканевом и клеточном уровнях [30].

С целью изменения активности мито K_{ATP} , активаторы которого обладают кардиопротекторными свойствами [31], животным за 1 ч до начала воздействия внутривенно вводили селективный активатор мито K_{ATP} – диазоксид в дозе 0,3 мг/100 г массы тела) либо селективный ингибитор мито K_{ATP} – 5-гидроксидеканоат (5HD) в дозе 0,5 мг/100 г массы тела [31]. Образцы ткани для электронно-микроскопических исследований отбирали через 90 мин после введения препаратов и через 30 мин после начала гипоксии.

После окончания гипоксической экспозиции крыс под слабым эфирным наркозом декапитировали, затем забирали кусочки ткани из верхушки сердца. Фиксацию материала производили немедленно 2,5%-ным раствором глутарового альдегида в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,4. Далее материал дополнительно фиксировали с помощью реактива Колфилда (на основе 2%-ного раствора OsO_4 , в 0,1 М фосфатном буфере – рН 7,4). Обезвоживание материала производили в спиртах возрастающей концентрации, абсолютном спирте и ацетоне с последующей заливкой в эпон-аралдит, которая осуществлялась по общепринятой методике [32].

Ультратонкие срезы толщиной 40–60 нм для просмотра в электронном микроскопе контрастировали 1%-ным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца по методике Рейнольдса [33]. Просмотр препаратов осуществляли с помощью электронных микроскопов JEM 100СХ («JEOL», Япония) и ПЕМ-125К («Сумы», Украина).

Морфо- и стереометрические параметры – общее количество МХ, количество структурно измененных МХ, средний диаметр МХ, площадь МХ, сумму поверхностей митохондрий в единице объема ткани ($S_{i\text{tot}}$) – определяли с по-

мощью компьютерной программы для морфометрических подсчетов Image Tool Version 3 (США) на 130–150 полях (а) для каждого воздействия.

Работу с лабораторными животными выполняли в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986 г.) и с принципами Хельсинской декларации (2000 г.).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2003 («Microsoft Corporation», США) с использованием критерия ϕ Фишера и критерия t Стьюдента. Различия между средними величинами считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рис. 1 представлен анализ характерных изменений МХ в клетках миокарда при создании в организме 30-мин гипоксической гипоксии. Показано, что при этой форме гипоксии некротические изменения в митохондриях выражены слабо. Их проявление в два раза чаще встречались в СС МХ, где они составляли 19,8% от общего количества различных изменений, выявленных в МХ при гипоксии. Для ИМФ МХ эти изменения составляли всего 8,0%. В миокарде контрольных животных некроз МХ составлял 2,8% в СС МХ и 5,0% в ИМФ МХ.

Исследование ультраструктуры митохондриального аппарата миокарда при данной модели

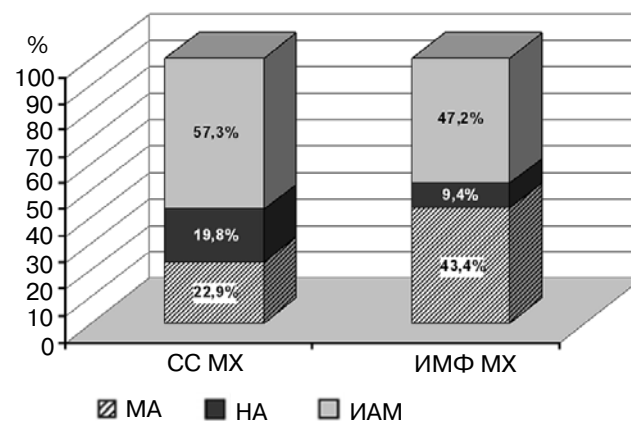


Рис. 1. Структурные изменения в субпопуляциях митохондрий кардиомиоцитов при гипоксической гипоксии (в % от общего количества морфологически измененных МХ, принятого за 100%). МИ – митопототические изменения; НИ – некротические изменения; ИАМ – изменения, направленные на нормализацию энергетических процессов

гипоксии показало увеличение количества как СС МХ, так и ИМФ МХ, причем количество СС МХ изменялось в большей степени, чем в ИМФ субпопуляции органелл (в 2,7 и 1,9 раза по сравнению с контролем соответственно). Кроме возрастания диаметра МХ вследствие увеличения проницаемости митохондриальных мембран в гипоксических условиях (таблица), выявлялось также увеличение средней площади МХ: в ИМФ МХ, в среднем, на 70,0% (с 7726 ± 118 до 13135 ± 146 у.е., $p < 0,05$), а в СС МХ – в среднем, на 50,0% (с 4864 ± 83 до 7297 ± 122 у.е., $p < 0,05$). Подобные изменения обеих величин, наряду с активацией морфогенеза МХ, и приводили к возрастанию суммы поверхностей митохондрий в единице объема ткани. Количество структурно измененных МХ при этом было увеличено, главным образом, в ИМФ МХ. Средний диаметр всех МХ также увеличивался в 1,5–1,8 раз, вследствие чего суммарная поверхность митохондрий возрастала на 30,9–79,5% в зависимости от субпопуляции органелл (таблица).

В условиях гипоксии СС МХ часто заполняли все поле зрения микроскопа и приобретали округлую форму (рис. 2, а). Помимо увеличения количества МХ, нередко наблюдаются инвагинации сарколеммального края кардиомиоцитов, в которых располагаются МХ (рис 2, б), обеспечивая большую эффективность диффузии кислорода к МХ. В контрольных опытах (рис. 2, в) увеличения количества СС МХ и инвагинаций сарколеммы не наблюдали.

В условиях гипоксии значительная часть МХ, подвергшихся ультраструктурным изменениям, содержала в себе небольшие (с максимальным диаметром до 0,1 мкм, в основном, –10–50 нм) оптически плотные образования (рис. 3, а), сходные по своей структуре с интактными митохондриями. Следует обратить внимание на то, что эти образования появлялись скорее в МХ с

неизменными кристами, чем в просветленных МХ с уменьшенным числом крист. Мы полагаем, что в используемых нами условиях в опытах *in vivo* возможна реализация процессов, выявленных ранее в опытах *in vitro* в разрушающихся митохондриях кардиомиоцитов при длительной аноксии, и они были названы авторами микроМХ [18, 20]. В опытах *in vivo* подобного рода образования были обнаружены впервые. Нам удалось проследить стадии формирования микроМХ в гипоксических условиях и они, как оказалось, соответствуют описанному ранее «митохондриальному конвейеру», имеющему место при образовании МХ в тканях организма [7, 8]. В некоторых МХ выявлены несколько вновь образованных микроМХ (рис. 3, а). В МХ, не содержащих микроМХ, появлялись борозды, указывающие на деление митохондрий, что, в конечном счете, должно приводить к увеличению количества функционирующих МХ (рис. 3, а). Следует подчеркнуть, что делящиеся МХ встречаются в поле зрения микроскопа значительно чаще при гипоксии, чем в контрольном миокарде (данные не приведены).

Для выяснения возможного механизма образования микроМХ, мы, учитывая ранее обнаруженное нами и другими исследователями кардиопротекторное действие активаторов митоK_{АТФ} [22, 23, 25], исследовали роль модуляторов канала в образовании этих органелл. Как видно из рис. 4, при нормоксии, микроМХ в МХ кардиомиоцитов не обнаруживались, в то время как при гипоксическом воздействии 27% МХ их содержали. Введение животным за 1 ч до создания гипоксии диазоксида, активатора митоK_{АТФ} АТФ-зависимого калиевого канала, увеличивало количество органелл с микроМХ до 36%, в то время как 5HD, ингибитора канала, почти полностью предотвращал их образование (количество МХ с микроМХ снижалось до 8%).

Морфометрические и стереометрические характеристики митохондрий в миокарде при острой гипоксической гипоксии ($M \pm m$, $n = 10$)

Условия эксперимента	Общее количество митохондрий, ед/мкм ²		Количество структурно измененных митохондрий, %		Средний диаметр митохондрий, мкм		Сумма поверхностей митохондрий в единице объема ткани, мкм ²	
	СС	ИМФ	СС	ИМФ	СС	ИМФ	СС	ИМФ
Контроль (а = 150)	12,5 ± 1,6	8,4 ± 1,1	4,1 ± 0,6	2,7 ± 0,4	0,50 ± 0,04	0,76 ± 0,07	8,3 ± 0,8	6,8 ± 0,9
Гипоксия (а = 140)	33,7 ± 3,4**	16,0 ± 2,3*	26,8 ± 4,7**	21,2 ± 3,3**	0,74 ± 0,09*	1,35 ± 0,12**	14,9 ± 1,6*	8,9 ± 0,7*

а – Количество случайно выбранных для расчетов участков.

* Различия достоверны относительно контрольных величин ($p < 0,05$).

** Различия достоверны относительно контрольных величин ($p < 0,01$).

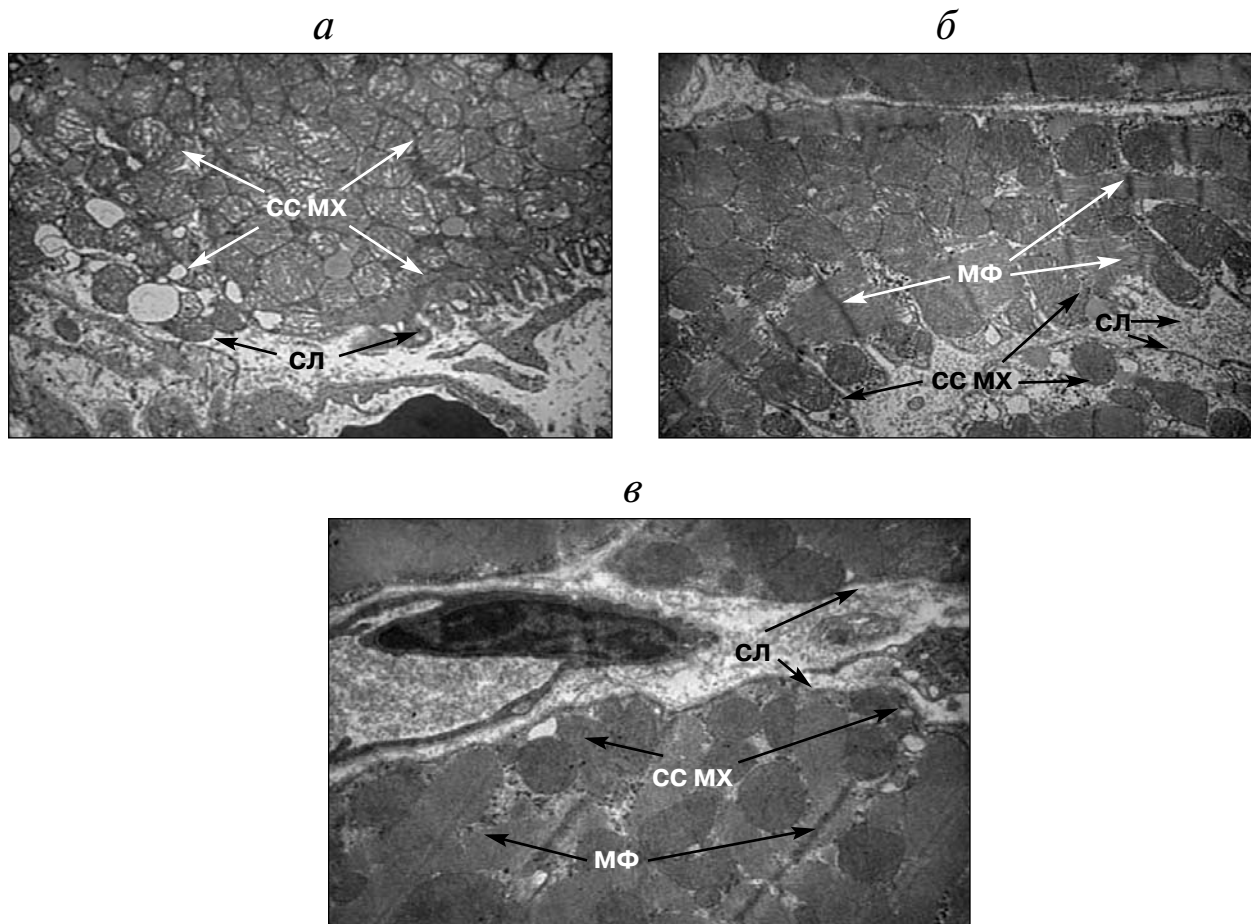


Рис. 2. *а* – Особенности субсарколеммальной субпопуляции митохондрий при гипоксической гипоксии; *б* – митохондрии в инвагинациях сарколеммального края кардиомиоцитов при гипоксической гипоксии; *в* – субсарколеммальная субпопуляция митохондрий (СС МХ) контрольного животного. СЛ – сарколема; МФ – миофибриллы. Увеличение $\times 8200$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение ультраструктуры и пространственной локализации митохондрий в миокарде при 30-мин гипоксической гипоксии показало, что при этом существенных некротических повреждений МХ не наблюдается. Напротив, в них появляются морфологические изменения, которые принято рассматривать как направленные на усиление компенсаторных возможностей митохондриального аппарата кардиомиоцитов и нормализацию энергетических процессов (рис. 1), а именно – умеренное (до 25% от исходного диаметра) набухание, образование везикулярных, дугообразных, кольцевых крист и их анастомозирование [17, 34]. Кардиомиоцит в этих условиях мобилизует свои компенсаторно-приспособительные возможности, направленные на улучшение условий диффузии кислорода в клетку и повышение энергетической мощности МХ.

Это выражается, прежде всего, в увеличении суммы поверхности митохондрий в единице объема миокарда, которое более выражено в СС МХ, по сравнению с ИМФ МХ (в 1,8 и 1,3 раза соответственно) (таблица). Важность данного параметра определяется тем, что он отражает суммарную длину митохондриальных мембран, расположенных в объеме ткани миокарда [35]. Поскольку основная митохондриальная функция – энергетическая – обуславливается работой дыхательных ферментов МХ, являющихся мембраносвязанными, то протяженность мембран МХ может быть косвенным показателем способности МХ к участию в энергетическом метаболизме клеток. Общее количество МХ при этом повышается (более выражено в субсарколеммальной субпопуляции МХ), как за счет усиления деления МХ, так и за счет образования новых органелл (рис. 3). Большую выраженность описанных выше изменений в СС МХ

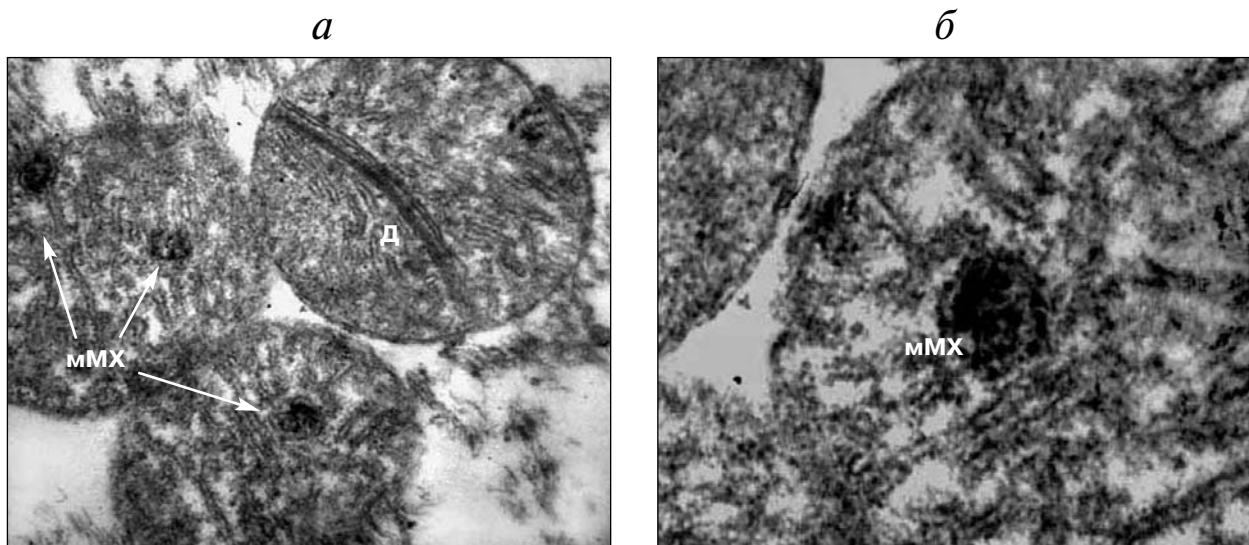


Рис. 3. Структурные перестройки митохондрий (МХ) кардиомиоцитов при острой гипоксической гипоксии. Д – деление МХ, мМХ – микроМХ. (а) и (б) – Варианты митохондрий с включенными в них мМХ; увеличение $\times 24\,500$ и $\times 32\,500$ соответственно

можно связать с характером воздействия, так как при гипоксии основным патогенетическим фактором является недостаточное поступление кислорода. Поэтому именно МХ, расположенные у сарколеммы должны претерпевать изменения, обеспечивающие больший захват кислорода из крови и усиление энергетической мощности митохондриального аппарата.

Кроме того, как следует из проведенных нами расчетов, при изучаемом типе гипоксии процент МХ с измененной, по сравнению с контролем, ультраструктурой в ИМФ МХ был выше, чем в СС МХ (в 8,0 и 6,5 раза соответственно) (таблица). Эти данные также не подтверждают мнения о большей повреждаемости СС МХ при неблагоприятных воздействиях [4, 7, 8]. Они вполне логичны, так как ИМФ МХ удалены от капилляра, и в них более выражен недостаток кислорода.

Выявленные изменения морфо- и стереометрических характеристик МХ обеих субпопуляций характеризуют проявление компенсаторных возможностей митохондриального аппарата кардиомиоцитов при значительных структурных изменениях МХ в гипоксических условиях.

Как было нами обнаружено (рис. 2, а), в гипоксических условиях СС МХ часто заполняли все поле зрения микроскопа и приобретали округлую форму. Некоторые исследователи предлагают рассматривать подобный процесс как одну из начальных стадий апоптоза, когда происходит сжатие клетки: клетка уменьшается в размерах; цитоплазма уплотняется; органеллы, которые выглядят относительно нормальными,

располагаются более компактно. Предполагается, что нарушение формы и объема клетки происходит в результате активации в апоптотических клетках трансглутаминазы и характеризует рецептор-зависимый (немитохондриальный) путь апоптоза [13, 34, 36, 37].

Мы склонны связывать обнаруженные при 30-мин гипоксии увеличения количества митохондрий у цитоплазмы не с активацией апоптоза, а с необходимостью обеспечения адекватного энергетического метаболизма в миокарде при гипоксии. Полагаем, что увеличение количества МХ у сарколеммы, т.е. в местах обеспечения оп-

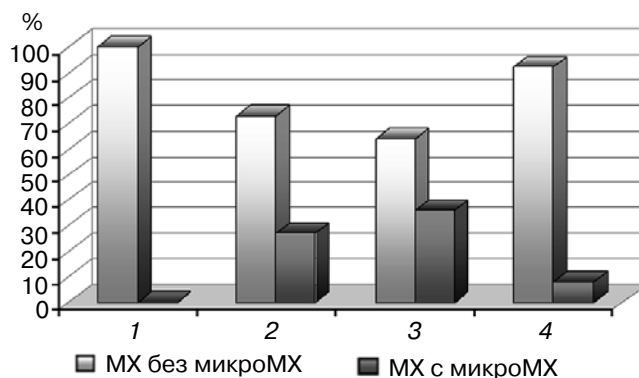


Рис. 4. Изменение количества микроМХ в клетках ткани сердца при модуляции активности митоK_{ATP} (различия достоверны относительно гипоксии, во всех случаях $p < 0,05$). 1 – контроль, 2 – гипоксия, 3 – гипоксия + диазоксид, 4 – гипоксия + 5HD

тимальной диффузии O_2 из крови капилляров, а также в местах инвагинаций сарколеммального края кардиомиоцитов, увеличивающих площадь диффузии (рис. 1, б), по всей видимости, регулируются при гипоксии активным функционированием цитоскелетных систем, в частности, десминовых промежуточных филаментов, способных удерживать митохондрии в строго определенных местах [12, 15, 38].

Обращает на себя внимание образование при гипоксии МХ с так называемой везикулярной структурой крист (рис. 3). Появление дугообразных и кольцевых крист в МХ, их анастомозирование, приводит к тому, что один из концов кристы обязательно контактирует с наружной митохондриальной мембраной. Это является необходимым условием для эффективного функционирования кристы [6]. Следовательно, появление везикулярных крист может являться свидетельством включения на клеточном уровне компенсаторно-приспособительных механизмов, призванных способствовать сохранению или повышению энергообразующей поверхности крист в гипоксических условиях.

Данная особенность может в определенной степени служить объяснением наличия конструктивного эффекта гипоксии в плане оптимизации энергетического метаболизма тканей организма, а также в плане тренирующего эффекта гипоксии, способствующего нормализации энергетического обмена при неблагоприятных воздействиях.

Как указывалось выше, в наших экспериментах, проведенных в условиях 30-минутной гипоксии, было обнаружено, что значительная часть МХ, подвергшихся ультраструктурным изменениям, содержала в себе небольшие оптически плотные образования, по своей структуре сходные с интактными митохондриями (рис. 3, а и б). Иногда, в одной МХ было видно появление 2–3 подобных образований (рис. 3, а). Они напоминают выявленные в опытах *in vitro* в митохондриях кусочков сердца длительно инкубированных (6–72 ч при 20°) в условиях аноксии структуры, названные микроМХ [18, 20]. Мы предполагаем, что данный процесс, по-видимому, носит вероятностный характер — для образования микроМХ необходимым условием является концентрация в одном участке необходимого пластического, генетического и энергетического материала. Именно поэтому, в некоторых МХ выявляется несколько вновь образованных микроМХ, а часть органелл их не содержит, что отражает хорошо известный факт гетерогенности митохондрий.

Так как наши эксперименты проводились в условиях *in vivo*, можно рассматривать появле-

ние микроМХ как один из путей, направленных на сохранение энергетической мощности митохондриального аппарата при гипоксии. К этому выводу мы пришли также в результате проверки действия известных кардиопротекторов, защищающих сердце от ишемии, а именно модуляторов мито K_{ATP} [22–24]. Так как активатор канала диазоксид, который по многочисленным литературным данным [26, 28] защищает сердце от гипоксии, усиливал образование микроМХ, а ингибитор канала — 5HD, который снимает кардиопротекторный эффект активации канала [23, 25, 31], практически предупреждал их образование (рис. 4), мы полагаем, что появление микроМХ при гипоксии является положительным фактором и участвует в защите сердца от ишемии. Следовательно, образование микроМХ при острой гипоксической гипоксии можно рассматривать как один из путей, направленных на сохранение оптимальной энергетической мощности митохондриального аппарата.

До настоящего времени механизмы, ответственные за образование микроМХ, остаются практически неизученными [19]. Что касается другого типа морфологических изменений, таких как фрагментации митохондрий, то этот процесс на молекулярном уровне изучен довольно хорошо, особенно на дрожжах. В настоящее время уже выделены белки, ответственные за слияние и разделение митохондрий [39, 40]. Однако данные нашей работы показывают, что при гипоксии наблюдается по большей части не фрагментация, а образование новых микромитохондрий внутри измененных, «родительских» митохондрий. Бакеевой с соавт. и нами было показано, что при образовании микроМХ сохраняется целостность наружной и внутренней митохондриальных мембран.

Таким образом, при 30-мин гипоксической гипоксии в митохондриях миокарда крыс наблюдаются структурно-динамические изменения, указывающие на формирование в них компенсаторных процессов. При значительных структурных изменениях органелл благодаря наличию конструктивного и тренирующего эффектов гипоксии в миокарде появляется способность к нормализации энергетического обмена. Проведенные исследования позволили предположить, что мито K_{ATP} является одним из регуляторов морфологического состояния МХ при гипоксии, что может объяснить известное кардиопротекторное действие его активаторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства РФ (грант 14.Z50.31.0028) и ДПННиТ (грант 2014/281/2495).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васюк Ю.А., Куликов К.Г., Кудряшов О.Н., Крикунова А.В., Садулаева И.А. (2007) Вторичная митохондриальная дисфункция при остром коронарном синдроме, *Рациональная фармакология в кардиологии*, **1**, 41–47.
2. Лукьянова Л.Д. (1997) Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **124**, 244–254.
3. Cereghetti, G.M., and Scorrano, L. (2006) The many shapes of mitochondrial death, *Oncogene*, **25**, 4717–4724.
4. Karbowski, M., Youle, R.J. (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis, *Cell Death and Differentiation*, **10**, 870–880.
5. Collins, T.J., Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2002) Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells, *EMBO J.*, **21**, 1616–1627.
6. Скулачев В.П. (2001) Кислород и явления запрограммированной смерти, *Российский биомедицинский журнал*, **5**, 116–126.
7. Пауков В.С., Хитров Н.К. (1991) Адаптация сердца к гипоксии, Медицина, Москва, с. 240.
8. Розова Е.В. (2008) Изменения морфофункционального состояния митохондрий клеток тканей легких и сердца крыс при гипоксии различного генеза, *Журнал Національної Академії медичних наук України*, **14**, 752–765.
9. Некрасова О.Е. (2007) Изучение механизмов внутриклеточного распределения митохондрий, *Автореф. дисс. канд. биол. наук*, Москва, с. 20.
10. Некрасова О.Е., Кулик А.В., Минин А.А. (2007) Протеинкиназа С регулирует подвижность митохондрий, *Биологические мембраны*, **24**, 126–132.
11. Некрасова О.Е., Минин А.А., Кулик А.В., Минин А.А. (2005) Регуляция фибронектином формы и внутриклеточного распределения митохондрий, *Биологические мембраны*, **22**, 105–112.
12. Кулик А.В., Некрасова О.Е., Минин А.А. (2006) Фибриллярный актин регулирует подвижность митохондрий, *Биологические мембраны*, **23**, 42–51.
13. Пшенкина Н.Н. (2008) Метаболические аспекты регуляции апоптоза, вызванного действием экзогенных факторов, *Вестник Российской Военно-медицинской академии*, **23**, 219.
14. Milner, D.J., Mavroidis, M., Weisleder, N., and Capetanaki, Y. (2000) Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function, *J. Cell Biol.*, **150**, 1283–1298.
15. Paulin, D., and Li, Z. (2004) Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle, *Exp. Cell Res.*, **301**, 1–7.
16. Тоньшин А.А., Сапрунова В.Б., Бакеева Л.Е., Ягужинский Л.С. (2003) Функциональная активность и ультраструктура митохондрий, выделенных из апоптозной ткани сердца, *Биохимия*, **68**, 1070–1078.
17. Судакова Ю.В., Бакеева Л.Е., Цыпленкова В.Г. (1999) Энергозависимые изменения ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов человека при алкогольном поражении сердца, *Архив патологии*, **2**, 15–20.
18. Солодовникова И.М., Сапрунова В.Б., Бакеева Л.Е., Ягужинский Л.С. (2006) Динамика изменений ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов изолированного миокарда крысы при длительной инкубации в условиях аноксии, *Цитология*, **48**, 848–855.
19. Сапрунова В.Б., Казимирчук С.А., Тоньшин А.А., Бакеева Л.Е., Ягужинский Л.С. (2002) Индукция апоптоза в миокарде крыс в условиях аноксии, *Биохимия*, **67**, 293–302.
20. Сапрунова В.Б., Бакеева Л.Е., Ягужинский Л.С. (2003) Ультраструктура митохондриального аппарата кардиомиоцитов крыс при апоптозе, индуцированном длительным действием аноксии, *Цитология*, **45**, 1073–1082.
21. Сапрунова В.Б., Солодовникова И.М., Бакеева Л.Е. (2008) Выявление цитохром с-оксидазной активности в митохондриях кардиомиоцитов изолированной ткани миокарда при длительном действии гипоксии, *Цитология*, **50**, 268–274.
22. Garlid, K.D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Murray, H.N., Darbenzio, R.B., D'Alonzo, A.J., Lodge, N.J., Smith, M.A., and Grover, G.J. (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection, *Circ. Res.*, **81**, 1072–1082.
23. Krylova, I.P., Kachaeva, E.V., Rodionova, O.M., Negoda, A.E., Evdokimova, N.R., Balina, M.I., Sapronov, N.S., and Mironova, G.D. (2006) The cardioprotective effect of uridine and uridine-5'-monophosphate: The role of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel, *Exp. Geront.*, **41**, 697–703.
24. Mironova, G.D., Shigaeva, M.I., Gritsenko, E.N., Murzaeva, S.V., Gorbacheva, O.S., Germanova, E.L., and Lukyanova, L.D. (2010) Functioning of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel in rats varying in their resistance to hypoxia. Involvement of the channel in the process of animal's adaptation to hypoxia, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **42**, 473–481.
25. Миронова Г.Д., Качаева Е.В., Крылова И.Б., Родионова О.М., Балина М.И., Евдокимова Н.Р., Сапрунов Н.С. (2007) Митохондриальный АТФ-чувствительный калиевый канал. II. Роль канала в защите сердца от ишемии, *Вестник Российской АМН*, **2**, 44–50.
26. O'Rourke, B. (2004) Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection, *Circ. Res.*, **94**, 420–432.
27. Das, M., Parker, J., and Halestrap, A. (2003) Matrix volume measurements challenge the existence of diazoxide/glybenclamide-sensitive K_{ATP} channels in rat mitochondria, *J. Physiol.*, **547**, 893–902.
28. Foster, D.B., Ho, A.S., Rucker, J., Garlid, A.O., Chen, L., Sidor, A., Garlid, K.D., and O'Rourke, B. (2012) Mitochondrial ROMK Channel is a molecular component of mitoK_{ATP}, *Circ. Res.*, **111**, 446–454.
29. Таланов Е.Ю., Павлик Л.Л., Шигаева М.И., Белослудцева Н.В., Мошков Д.А., Миронова Г.Д. (2013) Обнаружение белка семейства KIR6 в митохондриях сердца и печени крыс методом иммуоэлектронной микроскопии, *Биологические мембраны*, **30**, 474–478.
30. Малкин В.Б. (1977) Острая и хроническая гипоксия, Наука, Москва, с. 319.
31. Миронова Г.Д., Качаева Е.В., Копылов А.Т. (2007) Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал. I. Структура канала, механизмы его функционирования и регуляции, *Вестник Российской АМН*, **2**, 34–43.
32. Карупу В.Я. (1984) Электронная микроскопия, Вища школа, Киев, с. 208.
33. Уикли Б. (1975) Электронная микроскопия для начинающих, Мир, Москва, с. 326.
34. Залесский В.Н., Великая Н.В. (2003) Механизмы цитотоксических эффектов активных молекул кислорода и развитие апоптоза, *Современные проблемы токсикологии*, **1**, 11–17.
35. Ташке К. (1980) Введение в количественную цитогистологическую морфологию, Изд-во Академии СРР, Бухарест, с. 192.

36. Ушакова Т.А., Глоба А.Г., Карелин А.А. (2007) Цитокиновый профиль и модуляция апоптоза при термической травме, *Иммунология*, **28**, 226–230.
37. Appaix, F., Kuznetsov, A.V., Usson, Y., Kay, L., Adrienko, T., Olivares, J., Kaambre, T., Sikk, P., Margreiter, R., and Saks, V. (2003) Adaptation of Mitochondria, *Exp. Physiol.*, **88**, 175–190.
38. Reipert, S., Steinbock, F., and Fischer, I. (1999) Association of mitochondria with plectin and desmin intermediate filaments in striated muscle, *Exp. Cell Res.*, **252**, 479–491.
39. Поляков В.Ю., Сухомлинова М.Ю., Файс Д. (2003) Как сливаются, фрагментируются и делятся митохондрии, *Биохимия*, **68**, 1026–1039.
40. Skulachev, V.P., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Domnina, L.V., Minin, A.A., Pletjushkina, O.Y., Saprunova, V.B., Skulachev, I.V., Tsyplenkova, V.G., Vasiliev, J.M., Yaguzhinsky, L.S., and Zorov, D.B. (2004) Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis, *Mol. Cell. Biochem.*, **256–257**, 341–358.

**STRUCTURAL AND DYNAMIC CHANGES
IN MITOCHONDRIA OF RAT MYOCARDIUM
UNDER ACUTE HYPOXIC HYPOXIA:
ROLE OF MITOCHONDRIAL ATP-DEPENDENT
POTASSIUM CHANNEL**

E. V. Rozova¹, I. N. Mankovskaya¹, G. D. Mironova^{2,3*}

¹ *A. A. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Bogomolets 4, Kiev 01024, Ukraine; fax: +7(380-044)256-2000, E-mail: erozova@ukr.net*

² *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow region 142290, Russia; fax: +7(4967)33-0553, E-mail: mironova40@mail.ru*

³ *Pushchino State Institute of Natural Sciences, pr. Nauki 3, Pushchino, Moscow region 142290, Russia*

Received July 1, 2014

Revision received February 09, 2015

Changes in the ultrastructure and spatial localization of mitochondria in the myocardium after 30 min hypoxic hypoxia were investigated. Some changes in myocardium aimed at strengthening of energy processes were revealed, including an increase in the number of mitochondria in the subsarcolemmal zone of hypoxic myocardium with changing of sublemmal membrane surrounding mitochondria, which improves oxygen diffusion to mitochondria due to increased diffusion area; amplification of mitochondria division thus increasing the number of mitochondria; appearance of structurally altered, electron dense mitochondria with small diameter, representing newly formed organelles – microMC. It was found that one of the regulators of morphological state of mitochondria under hypoxic hypoxia is the ATP-dependent potassium channel: diazoxide, a channel activator, increased the number of newly formed microMC, while 5-HD, an inhibitor of the channel, prevented their formation. Possible mechanisms of structural and dynamic changes in the mitochondrial apparatus of rat myocardium under acute hypoxia are discussed.

Key words: mitochondria, hypoxic hypoxia, ultrastructure, spatial localization, the mitochondrial ATP-dependent potassium channel, channel modulators