

© М. Н. Курбат, Р. И. Кравчук, О. Б. Островская, 2018
УДК 611.36.018.1:599.323.4

М. Н. Курбат, Р. И. Кравчук, О. Б. Островская

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИЙ ГЕПАТОЦИТОВ У ИНТАКТНЫХ КРЫС

Научно-исследовательская лаборатория (зав. — канд. мед. наук М. Н. Курбат), УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Республика Беларусь

Цель — комплексная морфометрическая оценка ультраструктуры митохондрий гепатоцитов на срезах печени интактных крыс.

Материал и методы. Исследование проведено на 5 белых нелинейных крысах-самцах массой $232,5 \pm 20,35$ г. Морфометрическая оценка ультраструктуры митохондрий гепатоцитов на срезах печени интактных крыс по комплексу показателей выполнена с помощью электронного микроскопа JEM-1011 и программного комплекса iTEM (Ver. 5.0).

Результаты. Митохондрии в гепатоцитах у половозрелых нелинейных интактных крыс многочисленны, отличаются полиморфизмом, имеют разветвленную форму и на срезах занимают около $1/3$ площади их цитоплазмы. Отмечается высокое содержание удлинённых митохондрий, которые при наличии многочисленных крист и матрикса умеренной электронной плотности считаются функционально активными.

Выводы. Морфометрическая характеристика митохондрий гепатоцитов у интактных нелинейных крыс может использоваться для сравнительной оценки изменений митохондриальной структуры, возникающих при моделировании различных патологических состояний, в том числе лекарственных поражений печени.

Ключевые слова: гепатоцит, митохондрии, морфометрия, электронная микроскопия

Развитие современных морфологических исследований в различных областях экспериментальной биологии и медицины, а также в области патологии человека базируется на совершенствовании методических подходов. Микроскопическое и особенно электронно-микроскопическое исследование, углубляя представления о патологическом процессе, одновременно увеличивают вероятность ошибочных заключений в связи с ограниченным объемом изучаемого органа. Описательный характер этих исследований недостаточен для глубокого анализа наблюдаемых патологических изменений и их взаимосвязей. Для полноценной морфологической оценки и улучшения диагностического процесса необходимы комплексные морфометрические исследования, возможности которых возрастают с использованием современной компьютерной техники.

В настоящее время особое внимание уделяется ультраструктурным преобразованиям митохондрий — важных органелл в клетках живых организмов.

Митохондрии имеют большое значение для нормального функционирования клеток. Они занимают ключевое положение в метаболическом процессе благодаря их энергетической функции, а также участию в апоптозе, контроле уровня

цитозольного иона кальция, липидном гомеостазе, синтезе стероидов, синтезе гема, врожденном иммунном ответе и метаболической сигнализации клеток [7, 19].

Митохондрии — это динамичные органеллы, которые постоянно сливаются и делятся, движутся вдоль цитоскелетных путей к участкам с высокой потребностью в энергии. Совокупность этих процессов носит название митохондриальной динамики. Баланс между слиянием и делением определяет строение митохондрий, форма которых может варьировать от небольших сфер/овалов и коротких трубочек до удлинённых трубочек и разветвленных сетей в зависимости от типа клеток в разных органах [10]. На основе морфологической 2D-картины, наблюдаемой при трансмиссионной электронной микроскопии, некоторые исследователи выделяют два различных способа деления митохондрий [9]. Обе эти разновидности были зарегистрированы в кардиомиоцитах у крыс. Преобладающим является способ, связанный с удлинением одной кристы, пока она не пересечет всю ширину митохондрии. Последующая инвагинация наружной мембраны, в конечном итоге, приводит к разделению органеллы. Второй вид процесса представляет собой «pinching» («перехватывание», «отщипывание»), при кото-

Сведения об авторах:

Курбат Михаил Николаевич (e-mail: vwmisha@mail.ru), *Кравчук Римма Ивановна*, *Островская Оксана Борисовна*, научно-исследовательская лаборатория, УО «Гродненский государственный медицинский университет», Республика Беларусь, 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80

ром сужение органеллы в определенных поверхностных участках приводит к ее истончению. При встрече мембран с противоположных сторон происходит деление митохондрии. Когда деление осуществляется в режиме «перехватывания», элементы гранулярного саркоплазматического ретикулума всегда являются связанными с областями сужения митохондрий. Теми же авторами показано, что в культивируемых фибробластах человека деление митохондрий происходит вторым («pinching») из вышеописанных способов [8]. Циклические слияния и деления митохондрий необходимы для поддержания их числа, качества и функциональной активности. Установлено, что митохондриальная динамика не только управляет их мембранным потенциалом, устойчивостью митохондриальной ДНК и митофагией, но и связана с регуляцией многих клеточных процессов, включая ответ на напряжение, клеточный цикл и апоптоз [21]. Одна из важнейших функций митохондрий — участие в регуляции и осуществлении каскада событий, включенных в запрограммированную клеточную смерть [12, 13]. В клетках, подвергающихся апоптозу, наблюдаются изменения митохондриальной морфологии, которые затрагивают как размеры и форму органелл, так и их внутреннюю архитектуру, включая число, длину, форму крист и характеристику кристных соединений [20, 21].

Изменение митохондриальной динамики под влиянием различных факторов приводит к изменениям структуры данных органелл и их перераспределению в клетке [3, 17, 20]. Тесная корреляционная связь между структурой митохондрий и их функцией заставляет исследователей обращаться к детальному изучению морфологических характеристик этих органелл при различных патологических состояниях и метаболических воздействиях [17, 18]. В частности, ремоделирование митохондрий происходит при ограничении доступности нутриентов, в процессе старения организма, при окислительном стрессе, а также при развитии раковых опухолей и целого ряда нейродегенеративных и метаболических расстройств [2, 10]. Топология внутренней митохондриальной мембраны также ремоделируется при изменении метаболического статуса органеллы и под воздействием ряда других эффекторов [14, 22].

В соответствии с центральной ролью митохондрий в клеточном метаболизме и регуляции апоптоза эти органеллы являются ключевой мишенью также при лекарственных и токсических поражениях печени и других органов [6, 11, 15]. При тестировании новых медикаментозных препаратов токсикологические исследования про-

водятся на экспериментальных животных [5]. В связи с этим для оценки ультраструктурных изменений, наблюдающихся в тканях при моделировании токсических воздействий и иных патологических состояний, целесообразно проведение детального морфометрического исследования митохондрий у интактных животных. Однако в литературе отсутствуют систематизированные обзоры по морфометрическому анализу митохондрий печени, что и послужило стимулом к проведению данного исследования.

Цель работы — комплексная морфометрическая оценка ультраструктуры митохондрий гепатоцитов на срезах печени у интактных крыс.

Материал и методы. Исследование проведено на 5 белых нелинейных крысах-самцах массой $232,5 \pm 20,35$ г. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Эксперимент выполнен с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными. Проведение исследования одобрено комитетом по биомедицинской этике учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» (протокол № 2 от 06.01.2015 г.).

Ультраструктурное исследование проводили в образцах печени, фиксированных 1 % раствором четырехоксида осмия (OsO_4 , Fluka, США) на 0,1M буфере Миллонига (Япония) при увеличениях 10 000–50 000 и ускоряющем напряжении 80 кВт. Для получения снимков использовали комплекс из цифровой камеры Olympus Mega View III (Германия) и программы iTEM [Version 5.0 (Build 1224); Serial Number A3766900–7E852FAB]. Обработку изображений осуществляли с использованием морфометрических инструментов программы «iTEM».

Программа iTEM обладает рядом стандартных встроенных алгоритмов для проведения морфометрии.

В процессе комплексной оценки морфологических изменений митохондрий в гепатоцитах использовались несколько групп параметров.

Количественные параметры:

- средняя суммарная площадь сечений митохондрий на 100 мкм^2 цитоплазмы (мкм^2);
- средняя площадь сечения одной митохондрии на срезе (мкм^2);
- число митохондрий на 100 мкм^2 площади цитоплазмы;
- относительное число измененных митохондрий (%);
- относительное число делящихся митохондрий (%), при этом считали делящейся органеллу гантелевидной формы, в которой диаметр в области сужения составляет 50 % или менее минимального поперечного диаметра митохондрии вне этой области;
- средний периметр одной митохондрии (мкм);
- средняя длина крист в одной митохондрии (мкм);
- расширение интракристных промежутков (мкм);
- концентрация внутренних мембран митохондрии (КВММ) на постоянной площади клетки (мкм^{-1}) [1].

КВММ рассчитывали по формуле:

$$\text{КВММ} = (P + 2L) \cdot n,$$

где P — средний периметр митохондрии; L — средняя длина крист в 1 митохондрии; n — число митохондрий на единицу тестируемой площади (площадь одного поля зрения) цитоплазмы гепатоцита.

Для подсчета отбирали и сканировали 10 непересекающихся снимков, содержащих не менее 30 сечений митохондрий, при ув. 50 000.

Комплексные параметры:

- фактор формы (FF) в интерфейсе программы «Shape factor», характеризующий «компактность» изучаемого объекта и степень разветвленности (для сферических объектов равен 1, для других форм <1, рассчитывается по формуле: $P^2/4S$, где P — периметр объекта, S — его площадь на срезе).

Топологический параметр:

- фактор элонгации, позволяющий оценить потерю округлости изучаемого объекта, определяется как отношение длины к ширине объекта.

Объемные параметры:

- соотношение сторон в интерфейсе программы «Aspect ratio», определяет отношение максимальной ширины к высоте прямоугольника, в который помещается изучаемый объект;
- диаметр эквивалентного круга (Equivalent Circle Diameter, ECD) определяет диаметр круга с площадью, эквивалентной площади измеряемого объекта;
- сферичность в интерфейсе программы «Sphericity», определяет округлость измеряемого объекта.

Денситометрический параметр:

- относительная электронная плотность матрикса митохондрий в интерфейсе программы «Gray value», определяет средний уровень всех оттенков серого цвета изучаемого объекта (см. рис. 2, 3).

В каждом препарате анализировали 20 непересекающихся полей зрения при увеличении 20 000 (площадь 1 поля зрения

равна 31,59 мкм²) и 10 полей зрения при увеличении 50 000 (площадь 1 поля зрения равна 4,94 мкм²).

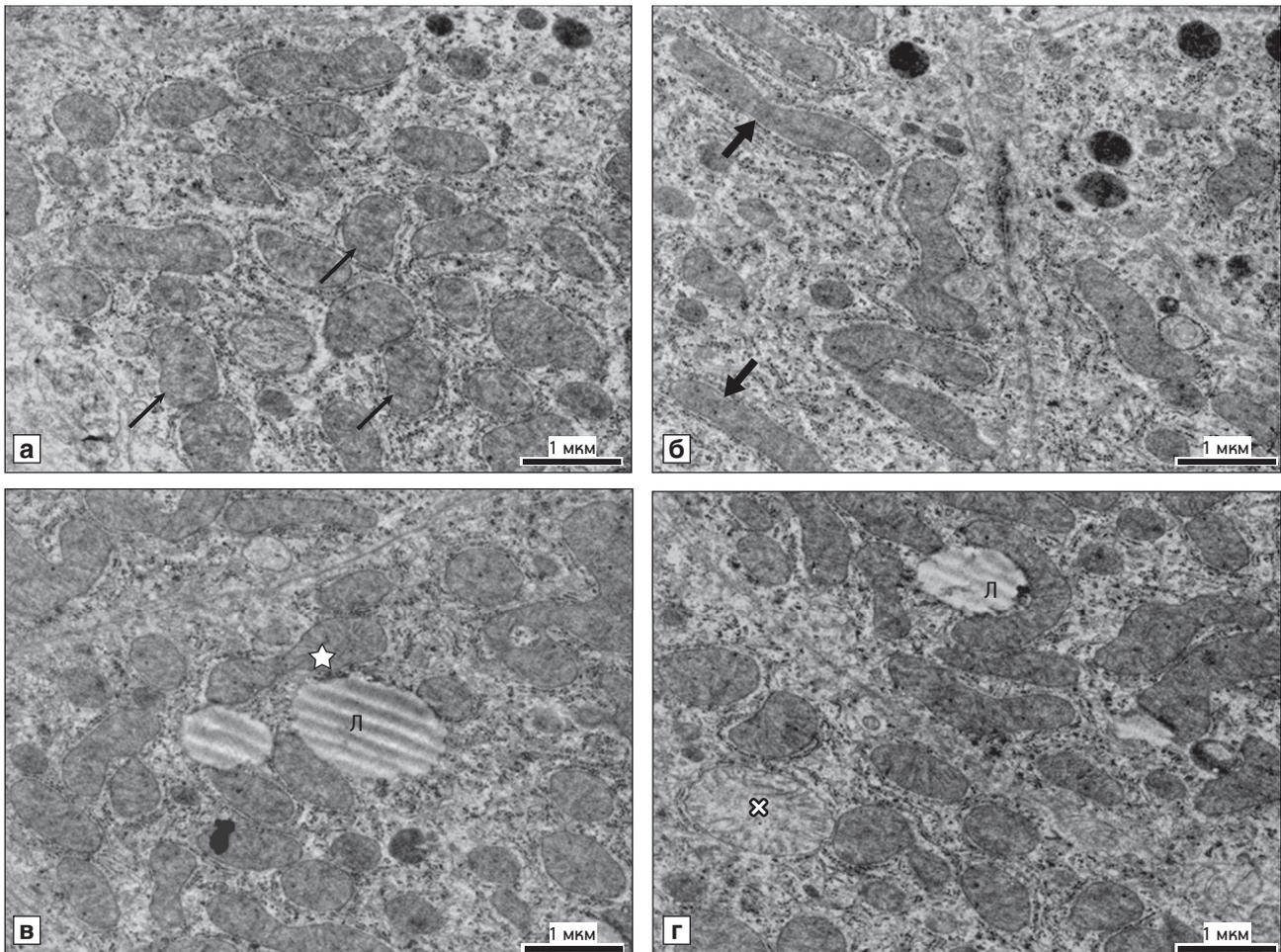
Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (серийный номер AXAR207F394425FA-Q). Оценку распределения осуществляли с помощью критерия Shapiro—Wilk. Данные представлены в виде медианы (Me) и 25–75 % интерквартильного интервала.

Результаты исследования. Визуально в гепатоцитах у интактных крыс выявлялись многочисленные митохондрии, равномерно распределенные в цитоплазме, местами образуя небольшие скопления в области ядра или на сосудистом полюсе, либо в непосредственной близости к латеральной поверхности клетки. Практически все органеллы содержали матрикс умеренной электронной плотности и умеренное число крист, ориентированных преимущественно поперек длинной оси органелл или имеющих неупорядоченную ориентацию. Интракристные промежутки не были расширены. Митохондрии отличались полиморфизмом, при этом в одних гепатоцитах преобладали органеллы овальной и бобовидной формы (рисунк, а), в других — удлинённые (рисунк, б). Среди основной популяции органелл встречались гипертрофированные митохондрии нерегулярной формы, ракеткообразные, а также митохондрии гантелевидной формы (см.

Морфометрические параметры митохондрий (Mx) гепатоцитов у интактных нелинейных крыс

Морфометрические параметры	Медиана [межквартильный размах между 25-м и 75-м процентилями]
Средняя суммарная площадь сечений митохондрий на 100 мкм ² цитоплазмы, мкм ²	28,9 [27,8; 30,9]
Среднее число митохондрий /100 мкм ² , шт.	84,2 [76,4; 85,5]
Доля делящихся митохондрий, %	3,49 [2,69; 4,42]
Доля изменённых митохондрий, %	0,35 [0,21; 0,37]
Area (средняя площадь сечения одной митохондрии), мкм ²	0,378 [0,362; 0,379]
Perimeter (средний периметр одной митохондрии), мкм	2,57 [2,53; 2,71]
Aspect Ratio (соотношение сторон)	1,99 [1,93; 2,05]
Elongation (фактор элонгации)	2,08 [2,04; 2,17]
GrayValue Mean (средняя относительная электронная плотность митохондрий)	117,3 [116,4; 118,0]
ECD (диаметр эквивалентного круга)	0,661 [0,649; 0,665]
Diameter Max	0,960 [0,955; 1,023]
Diameter Min	0,526 [0,519; 0,539]
Diameter Mean	0,848 [0,840; 0,897]
Sphericity (сферичность)	0,330 [0,309; 0,350]
Shape Factor (фактор формы)	0,712 [0,686; 0,720]
KBMM, мкм ⁻¹	5,06 [4,84; 5,52]
Средняя суммарная длина крист в 1 митохондрии, мкм	2,10 [1,90; 2,26]
Средняя длина 1 кристы, мкм	0,165 [0,156; 0,175]
Расширение интракристных промежутков, мкм	0,0120 [0,0111; 0,0123]

Примечание. Описание морфометрических параметров — см. в тексте.



Ультраструктурные особенности митохондрий гепатоцитов печени у интактных крыс.

а — гепатоцит с митохондриями бобовидной (тонкие стрелки) и округлой формы, содержащими неупорядоченно ориентированные кристы, наблюдается тесный топографический контакт митохондрий с цистернами ГрЭС; б — гепатоцит с митохондриями удлиненной формы (толстые стрелки), содержащими поперечно или неупорядоченно ориентированные кристы, наблюдается тесный топографический контакт митохондрий с цистернами ГрЭС; в — митохондрия гантелевидной формы (звездочка), тесный контакт митохондрий с липидными включениями (Л); г — измененная митохондрия (крестик); тесный контакт митохондрий с липидной каплей (Л). Электронограммы. Ув. 20 000

рисунок, в). По нашим наблюдениям в гепатоцитах у крыс деление митохондрий осуществляется «перехватыванием». На электронномикроскопических снимках кристы в виде поперечной перегородки часто отчетливо не выявляются или отсутствуют, хотя митохондрии имеют явную гантелевидную форму. Согласно указанному в методике критерию, гантелевидные митохондрии учитывались нами как делящиеся.

В гепатоцитах у интактных крыс также обнаруживались единичные измененные формы органелл, имеющие просветленный матрикс и укороченные кристы или уменьшенное их число (см. рисунок, г). Такие митохондрии считаются низкоэнергетическими и имеют «пониженную» биосинтетическую функцию.

Отмечалась тесная топографическая связь митохондрий с гранулярной эндоплазматической сетью (ГрЭС) (см. рисунок), с цистерна-

ми которой ассоциировались многочисленные рибосомы, что отражает интенсивность биосинтеза белка. Кроме того, наблюдался тесный контакт митохондрий с липидными включениями (см. рис. 3, в, г).

С помощью программы iTEM нами выполнены морфометрические измерения митохондрий в гепатоцитах у интактных крыс (таблица).

Обсуждение полученных данных. Проведенные исследования показали, что митохондрии в печени у половозрелых нелинейных интактных крыс многочисленны и занимают около $\frac{1}{3}$ площади цитоплазмы. Величина фактора формы подтверждает, что митохондрии в печени у интактных крыс отличаются полиморфизмом и имеют разветвленную форму. Значение фактора элонгации свидетельствует о высоком содержании удлиненных митохондрий, которые при наличии многочисленных крист и матрикса умеренной

электронной плотности считаются функционально активными. Высока вероятность, что подобные митохондрии являются результатом слияния либо впоследствии поделаются [4].

Таким образом, проведенное комплексное морфометрическое исследование митохондрий гепатоцитов у интактных нелинейных крыс может использоваться для сравнительной характеристики изменений митохондриальной структуры, возникающих при моделировании различных патологических состояний, в том числе лекарственных поражений печени.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: М. Н. К., Р. И. К., О. Б. О.

Сбор и обработка материала: М. Н. К., Р. И. К., О. Б. О.

Статистическая обработка данных: М. Н. К., О. Б. О.

Анализ и интерпретация данных: М. Н. К., Р. И. К., О. Б. О.

Написание и редактирование текста: М. Н. К., Р. И. К., О. Б. О.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Безбородкина Н.Н., Оковитый С.В., Кудрявцева М.В., Кирик О.В., Зарубина И.В., Кудрявцев Б.И. Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов нормальной и цирротически измененной печени крыс // *Цитология*. 2008. Т. 50, № 3. С. 228–235 [Bezborodkina N.N., Okovity S.V., Kudryavtseva M.V., Kirik O.V., Zarubina I.V., Kudryavtsev B.I. Morphometry of hepatocyte mitochondrial apparatus in normal and cirrhotic rat liver // *Cytologiya*. 2008. Vol. 50, № 3. P. 228–235. In Russ.].
- Babbar M., Sheikh M.S. Metabolic stress and disorders related to alterations in mitochondrial fission or fusion // *Mol. Cell Pharmacol*. 2013. Vol. 3, № 5. P. 109–133.
- Berman S.B., Pineda F.J., Hardwick J.M. Mitochondrial fission and fusion dynamics: the long and short of it // *Cell Death Differ*. 2008. Vol. 7, № 15. P. 1147–1152. doi: 10.1038/cdd.2008.57.
- Cagalinec M., Safiulina D., Liiv M., Liiv J., Choubey V., Wareski P., Veksler V., Kaasik A. Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons // *J. Cell Science*. 2013. Vol. 126. P. 2187–2197. doi: 10.1242/jcs.118844.
- Dragovic S., Vermeulen N.P.E., Gerets H.H., Hewitt P.G., Ingelman-Sundberg M., Park B.K., Juhila S., Snoeys J., Weaver R.J. Evidence-based selection of training compounds for use in the mechanism-based integrated prediction of drug-induced liver injury in man // *Arch. Toxicol*. 2016. Vol. 90. P. 2979–3003. doi: 10.1007/s00204-016-1845-1.
- Finsterer J., Zarrouk-Mahjoub S. Mitochondrial toxicity of cardiac drugs and its relevance to mitochondrial disorders // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*. 2015. Vol. 1, № 11. P. 15–24. doi: 10.1517/17425255.2015.973401.
- Friedman J.R., Nunnari J. Mitochondrial form and function // *Nature*. 2014. Vol. 505, № 7483. P. 335–343. doi: 10.1038/nature12985.
- Fujioka H., Tandler B., Consolo M.C., Karnik P. Division of mitochondria in cultured human fibroblasts // *Microsc. Res. Tech*. 2013. Vol. 12, № 76. P. 1213–1216. doi: 10.1002/jemt.22287.
- Fujioka H., Tandler B., Hoppel C.L. Mitochondrial Division in Rat Cardiomyocytes: An Electron Microscope Study // *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2012. Vol. 9, № 295. P. 1455–1461. doi: 10.1002/ar.22523.
- Galloway Ch.A., Lee H., Yoon Y. Mitochondrial morphology — Emerging role in bioenergetics // *Free Radic. Biol. Med*. 2012. Vol. 12, № 53. P. 2218–2228. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.035.
- Hu D., Wu C.Q., Li Z.J., Liu Y., Fan X., Wang Q.J., Ding R.G. Characterizing the mechanism of thiazolidinedione-induced hepatotoxicity: An in vitro model in mitochondria // *Toxicol Appl. Pharmacol*. 2015. Vol. 2, № 284. P. 134–141. doi: 10.1016/j.taap.2015.02.018.
- Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death // *Physiological Reviews*. 2007. Vol. 87, № 1. P. 99–163.
- Malhi H., Guicciardi M.E., Gores G.J. Hepatocyte death: a clear and present danger // *Physiological Reviews*. 2010. Vol. 90, № 3. P. 1165–1194. doi: 10.1152/physrev.00061.2009.
- Mannella C.A. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. № 1762. P. 140–147. doi: 10.1016/j.bbadis.2005.07.001.
- Orhan H. Extrahepatic targets and cellular reactivity of drug metabolites // *Curr. Med. Chem*. 2015. Vol. 4, № 22. P. 408–437.
- Otera H., Ishihara N., Mihara K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013. № 1833. P. 1256–1268. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.02.002.
- Otera H., Mihara K. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics // *J. Biochem*. 2011. № 149. P. 241–251. doi: 10.1093/jb/mvr002.
- Picard M., White K., Turnbull D.M. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study // *J. Appl. Physiol*. 2013. № 114. P. 161–171. doi: 10.1152/jap-physiol.01096.2012.
- Shaughnessy D.T., McAllister K., Worth L., Haugen A.C., Meyer J.N., Domann F.E., Van Houten B., Mostoslavsky R., Bultman S.J., Baccarelli A.A., Begley T.J., Sobol R.W., Hirschey M.D., Ideker T., Santos J.H., Copeland W.C., Tice R.R., Balshaw D.M., Tyson F.L. Mitochondria, Energetics, Epigenetics, and Cellular Responses to Stress // *Environmental Health Perspectives*. 2014. Vol. 122, № 12. P. 1271–1278. doi: 10.1289/ehp.1408418.
- Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2010. № 11. P. 872–884. doi: 10.1038/nrm3013.
- Yamaguchi R., Perkins G. Dynamics of mitochondrial structure during apoptosis and the enigma of Opa1 // *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. Vol. 8, № 1787. P. 963–972. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.02.005.
- Zick M., Rabl R., Reichert A.S. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. № 1793. P. 5–19. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.06.013.

Поступила в редакцию 10.12.2017

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE ULTRASTRUCTURE OF HEPATOCYTE MITOCHONDRIA IN THE INTACT RATS

M. N. Kurbat, R. I. Kravchuk, O. B. Ostrovskaya

Objective — complex morphometric evaluation of the ultrastructure of mitochondria of hepatocytes in liver sections of the intact rats.

Materials and methods. The study was carried out on 5 albino outbred male rats weighing 232.5 ± 20.35 g. Morphometric evaluation of the ultrastructure of mitochondria of hepatocytes on sections of the liver of intact rats performed with the electron microscope JEM-1011 and the iTEM software package (Ver. 5.0).

Results. Mitochondria in hepatocytes of sexually mature non-linear intact rats are numerous and polymorphous, have a branched form and in sections occupy about $1/3$ of the area

of their cytoplasm. High content of elongated mitochondria was noted, which, together with the numerous cristae and a matrix of moderate electron density, are considered to be the signs of high functional activity. The results of the mitochondrial measurements of mitochondria in hepatocytes of intact rats performed with the iTEM program are presented.

Conclusions. The morphometric characterization of hepatocyte mitochondria of the intact outbred rats can be used for comparative evaluation of the changes in the mitochondrial structure that arise in the modeling of various pathological conditions, including drug-induced liver disease.

Key words: *hepatocyte, mitochondria, morphometry, electron microscopy*

Scientific Research Laboratory, Grodno State Medical University, 80 Gorkiy St., Grodno, Belarus 230009