



УДК 57.086.83+616.089.843]:616.153.922-092.4

Структурно-функциональные нарушения митохондрий печени при атеросклерозе в эксперименте

Н. П. Судаков^{1,3}, М. А. Новикова³, С. Б. Никифоров¹, И. В. Клименков^{1,4},
Г. А. Невинский⁵, Ю. М. Константинов², С. А. Лепехова¹

¹Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН, Иркутск

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

³Иркутский государственный университет, Иркутск

⁴Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

⁵Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail: npsudakov@rambler.ru

Аннотация. Изучены структурно-функциональные нарушения митохондрий гепатоцитов при экспериментальном атеросклерозе (135 суток). Показано, что в печени животных с моделью гиперхолестеринемии происходит угнетение дыхания митохондрий, характеризуемое снижением активности сукцинатдегидрогеназы и истощением запасов гликогена. Это сопровождается фрагментацией крист митохондрий, набуханием, деструкцией и вакуолизацией органелл. Полученные результаты позволяют предполагать участие митохондриальной дисфункции в механизмах развития дислипидемии.

Ключевые слова: митохондрии, атеросклероз, гиперхолестеринемия, печень.

Атеросклероз коронарных и мозговых сосудов, несмотря на постоянное совершенствование методов профилактики и лечения, продолжает оставаться одной из основных причин увеличения смертности населения в России и других индустриально развитых странах. Основной причиной является мультифакторность и сложность патогенеза, а также недостаточно изученная целостная картина механизмов развития атеросклероза. В этой связи актуальным является поиск дополнительных механизмов патогенеза и факторов ослабления резистентности организма к данному заболеванию. В настоящее время существует аргументированная гипотеза, предполагающая, что накопление нарушений в митохондриальном геноме и прогрессирование митохондриальной дисфункции является одной из причин старения организма и развития различных патологических процессов [3]. Можно предположить, что прогрессирующее повреждение митохондрий в клетках печени при развитии гиперхолестеринемии может взаимодействовать с компонентами патогенетических механизмов атеросклероза, и создавать благоприятные условия для их реализации за счет ослабления компенсаторных антиатерогенных механизмов в печени. Понимание этих механизмов откроет перспективы для создания новых биомедицинских техноло-

гий профилактики и лечения атеросклероза с использованием возможности протекции митохондриальных структур и коррекции митохондриальной дисфункции.

Материалы и методы

В качестве экспериментальных животных использовали кроликов породы «шиншилла». Гиперхолестеринемия моделировалась по методике Н. Н. Аничкова атерогенной диетой [1]. Экспериментальные наблюдения проводили на 12 кроликах в течение 135 суток. Животные были подразделены на 2 группы, в каждой из которых находилось по 6 кроликов. Группа № 1 получала стандартную диету вивария. Животные группы № 2 находились на ежедневной холестериневой диете из расчета 250 мг/кг веса животного. Состояние липидного обмена в крови экспериментальных животных анализировали на 135-е сутки наблюдения перед эвтаназией. Все манипуляции с экспериментальными животными осуществлялись согласно правилам проведения работ с использованием животных в эксперименте (Министерство здравоохранения СССР, Приказ 12 августа 1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных») и «Правилами проведения качественных клинических испытаний в Российской

Федерации» (утверждены Минздравом РФ и введены в действие с 1 января 1999 г.). Анализировали липидный спектр плазмы крови, агрегационную способность фракции атерогенных липопротеинов, процессов перекисного окисления липидов. Гистохимически в печени исследовали активность фермента сукцинатдегидрогеназы и определяли содержание гликогена. Проводили электронно-микроскопические исследования очищенной фракции митохондрий и гепатоцитов. Для статистической оценки материалов использовали непараметрическую статистику. Значимость различий оценивали по критерию Манна – Уитни. Межгрупповые различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

У животных с моделью гиперхолестеринемии (группа № 2) на 135-е сутки эксперимента наблюдался дисбаланс между атерогенной и антиатерогенной фракциями липопротеидов, увеличение агрегационной способности атерогенных липопротеинов (ЛПНП и ЛПОНП), выраженный липоидоз аорты с формированием липоматозных бляшек, морфологические изменения в печени. У животных с моделью гиперхолестеринемии (группа № 2) на 135 сутки эксперимента концентрация холестерина в крови возросла в 11,6 раз по отношению к контролю ($p < 0,05$). Наблюдаемое увеличение общего содержания холестерина в крови происходило преимущественно за счет возрастания холестерина фракции ЛПНП (медиана 25,21 ммоль/л). Уровень холестерина ЛПОНП в крови возрос в 7,1 раз в сравнении с животными контрольной группы ($p < 0,05$). В тоже время, концентрация холестерина антиатерогенной фракции ЛПВП уменьшилась по отношению к контролю в 2,4 раза, что свидетельствует о снижении процессов резорбции холестерина из тканей. Наблюдаемый дисбаланс липопротеинов в крови животных с моделью гиперхолестеринемии способствовал увеличению коэффициента атерогенности в 41 раз в отличие от контрольной группы ($p < 0,05$). Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о статистически достоверных различиях модели гиперхолестеринемии с группой контроля ($p < 0,05$) и характеризуют высокий атерогенный потенциал в крови экспериментальных животных.

Гистохимические исследования выявили большое количество липидных депозитов в клетках печени кроликов с моделью гиперхолестеринемии (окраска суданом IV), что является характерным признаком стеатоза (жирово-

го гепатоза) (рис.). Развитие липидной инфильтрации ткани печени у животных с моделью гиперхолестеринемии свидетельствует о глубоких нарушениях липидного обмена в данном органе, что также позволило предположить об угнетении процесса β -окисления жирных кислот в митохондриях гепатоцитов. На фоне наблюдаемых морфологических изменений определялось истощение запасов гликогена, а также выраженное снижение активности сукцинатдегидрогеназы. Регистрируемое в эксперименте уменьшение активности сукцинатдегидрогеназы, происходящее на фоне снижения в цитоплазме содержания гликогена свидетельствует о подавлении аэробного дыхания клеток печени под влиянием различных факторов экспериментальной гиперхолестеринемии. Отсутствие признаков ишемии ткани печени, вероятно, показывает начало развития в ней процесса тканевой гипоксии – состояния, при котором, несмотря на достаточное снабжение клеток кислородом, наблюдается подавление дыхания митохондрий. Зарегистрированное подавление аэробного дыхания в митохондриях гепатоцитов может способствовать угнетению процессов β -окисления жирных кислот, что является одной из возможных причин наблюдаемого нами формирования жировых депозитов (липоидоз) в клетках печени.

Установлено, что в митохондриях клеток печени животных с экспериментальной гиперхолестеринемией (ультратонкие срезы печени и препарат митохондрий) формируются дегенеративные изменения митохондрий (рис.). Количественный анализ полученной митохондриальной фракции животных с моделью гиперхолестеринемии, в отличие от контроля, показал формирование в них дегенеративных изменений, характеризующихся уменьшением количества крист (в 55 % органелл), фрагментацией крист (2 %), набуханием (0,5 %) и деструкцией (0,1 %) митохондрий. В некоторых случаях (3 %) наблюдали «сжатие» митохондрий. Внутри отдельных митохондрий (10 %) наблюдаются вакуолеподобные структуры, не характерные для группы контроля и не выявленные на ультроструктурных срезах печени. Является ли это следствием выделения митохондриальной фракции – предстоит выяснить в ходе дальнейших исследований. Согласно данным литературы эти изменения сопровождаются функциональными нарушениями митохондрий и предшествуют индукции опосредованных митохондриями механизмов программируемой гибели клетки [2].

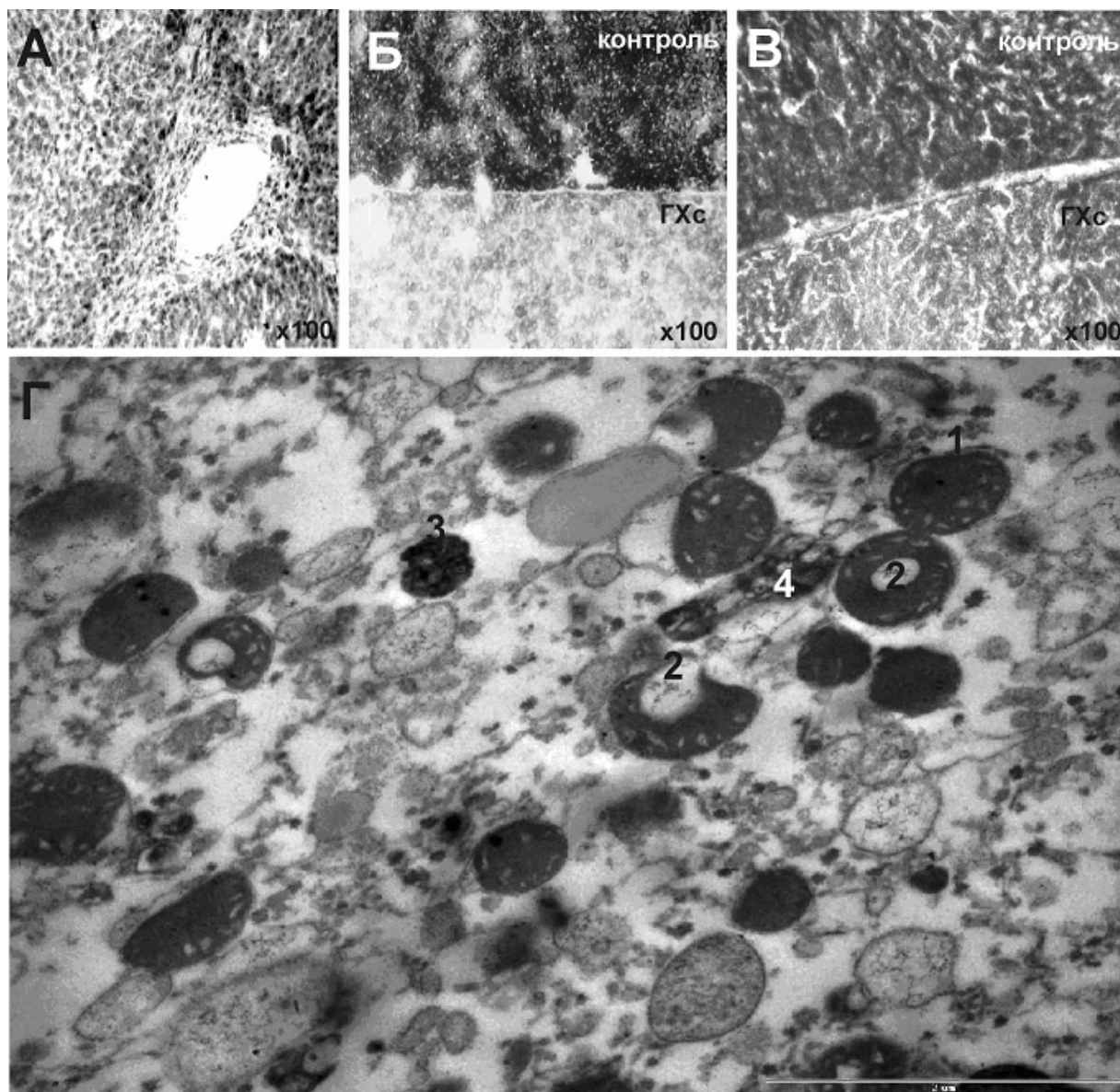


Рис. Развитие структурно-функциональных нарушений в митохондриях печени при экспериментальной гиперхолестеринемии (135-е сутки). А) липоидоз клеток печени при экспериментальной гиперхолестеринемии, окраска суданом IV; Б) истощение запасов гликогена в клетках печени кролика с моделью гиперхолестеринемии (ГХс) в сравнении с контролем (контроль), PAS-реакция; В) выраженное снижение активности сукцинатдегидрогеназы в печени кролика с моделью гиперхолестеринемии (ГХс) в сравнении с контролем (контроль), реакция с нитросиним тетразолием; Г) Ультраструктурные изменения митохондрий, выделенных из печени при экспериментальной гиперхолестеринемии: 1 – митохондрия без изменений структурной организации, 2 – митохондрия с вакуолью, 3 – конденсация митохондрии, 4 – набухание и деструкция митохондрии

Таким образом, на фоне подавления процессов аэробного дыхания в ткани печени формируется комплекс структурных изменений митохондрий, что еще более объективно свидетельствует о развитии дегенеративных нарушений в данных органеллах при моделировании гиперхолестеринемии. Наблюдаемая ассоциация формирования структурно-функцио-

нальных нарушений митохондрий с развитием в печени стеатоза с признаками хронического воспаления и прогрессированием экспериментальной гиперхолестеринемии позволяет предполагать участие митохондриальной дисфункции в механизмах развития дислипидопротеидемии. Для создания детальной концепции участия структурно-функциональных наруше-

ний митохондрий клеток печени в патогенезе гиперхолестеринемии и, как следствие – атеросклероза, безусловно, требуются дальнейшие исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционного комплексного проекта Президиума СО РАН № 5.1 и гранта РФФИ 05-04-22004-НЦНИ.

Литература

1. Анестиади В. Х. Морфогенез атеросклероза / В. Х. Анестиади, В. А. Нагорнев. – Кишинев : Штиинца, 1982. – 324 с.

2. Тоньшин А. А. Функциональная активность и ультраструктура митохондрий, выделенных из апоптозной ткани сердца / А. А. Тоньшин [и др.] // Биохимия. – 2003. – Т. 68, вып. 8. – С. 1070–1078.

3. Skulachev V. P. Programmed death phenomena: from organelle to organism / V. P. Skulachev // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2002. – Vol. 959. – P. 214–237.

The structural and functional disturbances of liver mitochondria during experimental atherosclerosis

N. P. Sudakov^{1,3}, M. A. Novikova³, S. B. Nikiforov¹, I. V. Klimenkov^{1,4}, G. A. Nevinsky⁵, Yu. M. Konstantinov², S. A. Lepekchova¹.

¹Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery of Eastern-Siberian Department of SB RAMS, Irkutsk

²Siberian Institute of Physiology and Biochemistry of Plants SB RAS, Irkutsk

³Irkutsk State University,

⁴Limnological Institute of SB RAS, Irkutsk

⁵Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

Abstract. It is studied structural and functional disturbances of liver mitochondria during experimental atherosclerosis (135 days). It is showed, that in liver of experimental animals with hypercholesterolemia are occurred depression of mitochondrial respiration, which characterized by succinate dehydrogenase activity lowering, and glycogen storage depletion. This process accompanied by mitochondrial crist fragmentation, swelling, destruction and vacuolization of these organelles. The obtained data allow us to suppose that mitochondrial dysfunction participates in dyslipoproteinemia development mechanisms.

Key words: mitochondria, atherosclerosis, hypercholesterolemia, liver.

Судаков Николай Петрович
 Научный центр реконструктивной
 и восстановительной хирургии ВСНЦ СО РАМН
 664079, г. Иркутск, Юбилейный, 100
 кандидат биологических наук
 научный сотрудник отделения экспериментальной
 хирургии с виварием
 тел. (395 2) 46–95–66, факс (395 2) 46–95–66
 E-mail: npsudakov@rambler.ru

Sudakov Nikolay Petrovitch
 Scientific Center of reconstructive and restorative
 surgery of Eastern-Siberian Department of SB RAMS
 664079, Irkutsk, 100, Yubileiny
 Ph. D. in Biology, research scientist,
 Branch of Experimental Surgery
 phone: (395 2) 46–95–66, fax: (395 2) 46–95–66
 E-mail: npsudakov@rambler.ru

Новикова Маргарита Анатольевна
 Научный центр реконструктивной
 и восстановительной хирургии ВСНЦ СО РАМН
 664079, г. Иркутск, Юбилейный, 100
 аспирант ИГУ
 тел. (395 2) 46–95–66, факс (395 2) 46–95–66

Novikova Margarita Anatolyevna
 Scientific Center of reconstructive and restorative
 surgery of Eastern-Siberian Department of SB RAMS
 664079, Irkutsk, 100, Yubileiny
 doctoral student
 phone: (395 2) 46–95–66, fax: (395 2) 46–95–66

Никифоров Сергей Борисович
 Научный центр реконструктивной
 и восстановительной хирургии ВСНЦ СО РАМН
 664079, г. Иркутск, Юбилейный, 100
 доктор медицинских наук
 старший научный сотрудник отделения
 экспериментальной хирургии с виварием
 тел. (395 2) 46–95–66, факс (395 2) 46–95–66

Nikiforov Sergey Borisovitch
 Scientific Center of reconstructive and restorative
 surgery of Eastern-Siberian Department of SB RAMS
 664079, Irkutsk, 100, Yubileiny
 D. Sc. in Biology, senior research scientist
 phone: (395 2) 46–95–66, fax: (395 2) 46–95–66

Клименков Игорь Викторович
Лимнологический институт СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, а/я 278
кандидат биологических наук, доцент
старший научный сотрудник отдела
ультраструктуры клетки
тел. (395 2) 42-32-80, факс (395 2) 42-54-05

Невинский Георгий Александрович
Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН
630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8
доктор химических наук, профессор
зав. лабораторией ферментов репарации
тел. (383) 335-62-26, факс (383) 333-36-77
E-mail: nevinisky@niboch.nsc.ru.

Константинов Юрий Михайлович
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
доктор биологических наук, профессор
зав. лабораторией
генетической инженерии растений
тел. (395 2) 42-49-03, факс (395 2) 51-07-54
E-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Лепехова Светлана Александровна
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии ВСНЦ СО РАМН
664079, г. Иркутск, Юбилейный, 100
кандидат биологических наук
зав. отделом экспериментальной хирургии с виварием
тел. (395 2) 46-95-66, факс (395 2) 46-95-66
E-mail: npsudakov@rambler.ru

Klimenkov Igor Viktorovitch
Institute of Limnology SB RAS
664033, Irkutsk, 3, Ulan-Batorskaya St.
Ph. D. in Biology, ass. prof, senior research scientist
отдела ультраструктуры клетки
phone: (395 2) 42-32-80, fax: (395 2) 42-54-05

Nevinsky Georgi Aleksandrovitch
Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine SB RAS
630090, Novosibirsk, 8, Lavrentiev Ave.
D. Sc. in Chemistry, Prof., Head of Laboratory of Repair
Enzymes
phone: (383) 335-62-26, fax: (383) 333-36-77
E-mail: nevinisky@niboch.nsc.ru.

Konstantinov Yuri Mikhailovitch
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
D. Sc. in Biology, Head of Laboratory of Plant Genetic
Engineering
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Lepekchova Svetlana Aleksandrovna
Scientific Center of reconstructive and restorative
surgery of Eastern-Siberian Department of SB RAMS
664079, Irkutsk, 100, Yubileiny
Ph. D. in Biology, Head of Branch of Experimental Surgery
phone: (395 2) 46-95-66, fax: (395 2) 46-95-66
E-mail: npsudakov@rambler.ru