

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ КЛЕТОК СТВОЛА МОЗГА У КРЫСЯТ, ПЕРЕНЕСШИХ ВНУТРИУТРОБНУЮ ГИПОКСИЮ

Поступила 04.09.14

Исследовали изменения состояния митохондрий (МХ) и иммуногистохимические особенности клеток ствола мозга у крысят, подвергнутых действию экспериментальной пренатальной гипоксии различной степени – умеренной и тяжелой (дыхание беременных самок газовыми смесями O<sub>2</sub> и N<sub>2</sub>, содержащими в себе 12 и 7 % O<sub>2</sub> соответственно). У 20 одномесячных крысят – потомков самок, подвергнутых гипоксии, и контрольных самок – исследовали ультраструктурные характеристики МХ клеток ствола мозга, а также иммуногистохимически определяли экспрессию генов *CD95 APO-1/Fas* и *Bcl-2*, модулирующих интенсивность апоптоза и митоптоза в этих клетках. Тяжелая внутриутробная гипоксия обуславливала развитие «структурного дистресса» МХ клеток ствола мозга; у многих МХ наблюдались все стадии деструкции (от отека до полного лизиса), а «юные» формы данных органелл отсутствовали. Обнаруживалось мозаичное разрушение миелина с деструкцией и проявлениями отека. После внутриутробной гипоксии умеренной степени более половины изменений ультраструктуры МХ можно было квалифицировать как направленные на повышение компенсаторных возможностей митохондриального аппарата нейронов. После умеренного пренатального гипоксического воздействия уровни экспрессии генов *CD95 APO-1/Fas* и *Bcl-2* в нейронах ствола мозга свидетельствовали о повышенной готовности нейронов к апоптозу и снижении возможности ингибирования его митохондриального пути. В то же время для МХ животных, перенесших внутриутробно тяжелую гипоксию, было характерно снижение способности к митоптозу, а в нейронах в целом – к апоптозу. Полученные результаты относительно влияния пренатальной гипоксии различной интенсивности на формирование структурно-функциональных изменений в МХ ствола мозга могут послужить основанием для разработки новых подходов к лечению митохондриальных болезней.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ствол мозга, внутриутробная (пренатальная) гипоксия, митохондрии (МХ), гены *CD95 APO-1/Fas* и *Bcl-2*.

### ВВЕДЕНИЕ

Перинатальная гипоксия является одним из важнейших пусковых факторов, инициирующих цепь патологических реакций, которые обуславлива-

ют широкий спектр негативных нейросоматических отклонений; последние проявляются у детей как непосредственно после рождения, так и в дальнейшем. Эти отклонения в значительной мере основываются на нарушениях энергетического метаболизма. В настоящее время накоплен большой объем данных о физиологических, биохимических и молекулярных механизмах эффектов пре- и постнатальной гипоксии. Соответствующие процессы характеризуются сложной динамикой и контролируются многочисленными механизмами на организменном, клеточном и молекулярном уровнях. В связи с этим, несмотря на почти столетнюю историю исследований в указанной области, многие патогенетические аспекты гипоксических повреж-

<sup>1</sup>Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

<sup>2</sup>Высшее государственное учебное заведение Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», Полтава (Украина).

<sup>3</sup>Межведомственная научная лаборатория медико-биологического мониторинга Мелитопольского государственного педагогического университета им. Богдана Хмельницкого и Таврической государственной агротехнической академии, Мелитополь (Украина).

Эл. почта: erogova@ukr.net (Е. В. Розова, М. Г. Дубовая);  
doktor64@mail.ru (В. И. Похилько);  
eritrocit@ukr.net (Н. Г. Сидорьяк).

дений, а также ряд принципиальных вопросов, касающихся антигипоксической защиты организма и функционирования отдельных органов и систем в условиях гипоксии, до настоящего времени остаются невыясненными [1, 2].

Очевидно, что выявление ключевых особенностей энергетического обмена в условиях кислородной недостаточности имеет принципиальное значение как для фундаментальной науки, так и для практической медицины. Параметры энергетического обмена являются ведущими прогностическими критериями степени тяжести гипоксических нарушений. Значение исследований в этой области повышается в связи с тем, что существует тесное взаимодействие характеристик энергетического обмена и функционально-метаболического статуса организма в целом [1].

Поскольку основная часть энергетического метаболизма реализуется на мембранах митохондрий (МХ) в процессе аэробного клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, именно митохондриальная дисфункция (МХД) при развитии гипоксических состояний играет ведущую роль в нарушении и декомпенсации энергетического обеспечения различных клеток, в том числе нейронов [3, 4].

Митохондриальные расстройства, которые когда-то рассматривались как относительно редкие феномены, сейчас считаются одними из наиболее частых расстройств метаболизма у детей. «Классическая болезнь МХ» обнаруживается в ряде случаев аутизма; она обычно вызывается генетическими аномалиями или нарушениями дыхательного пути. Эта болезнь также выявляется при перинатальных повреждениях мозга и нарушениях когнитивных и ассоциативных функций в условиях ряда церебральных патологий [3, 5, 6]. В этих случаях исследователи часто обнаруживают свидетельства МХД, однако без ряда классических признаков, присущих митохондриальной болезни. Среди таких признаков могут оказаться расстройства обратимого захвата медиаторов (катехоламинов, дофамина, серотонина) и быстрое снижение энергетических запасов в нервных клетках, формирование специфического комплекса открывания митохондриальных пор (МХП) и модификации процесса митоптоза. Наиболее известными и исследованными индуктором и ингибитором указанного процесса в мозгу в настоящее время считаются гены *CD95 APO-1/Fas* и *Bcl-2* соответственно [3, 7]. Открывание МХП превращает МХ из энергопродуци-

рующих органелл в активных потребителей субстратов окисления без образования АТФ [3].

Динамика формирования структурных и функциональных изменений в различных органах и тканях при гипоксии в значительной степени определяется темпами ее развития, характером факторов, инициирующих данное состояние, и особенностями компенсаторно-приспособительных реакций в том или ином органе. Устойчивость тканей различных органов и систем к гипоксии широко варьирует. Общеизвестно, что наиболее чувствительна к гипоксии нервная система; уже через 10–15 мин после развития этого состояния в нейронах продолговатого мозга и других отделов ствола возникают глубокие структурные изменения, существенно затрагивающие клеточные органеллы [7, 8]. Общей реакцией мозга на повреждения почти любой природы является активация процесса свободнорадикального окисления, сопровождающегося интенсификацией перекисного окисления липидов. Токсичные продукты перекисного окисления, которые образуются в данных условиях, вызывают разрушение биологических мембран и нарушение их функций. В первую очередь при этом страдают именно мембраны МХ нейронов; их проницаемость для ионов увеличивается, а разность потенциалов на указанных мембранах, необходимая для синтеза АТФ из АДФ и ортофосфата, падает [9, 10]. Повреждения ультраструктуры МХ обуславливают их функциональную неполноценность, что, в свою очередь, приводит к существенным нарушениям энергетического метаболизма клеток мозга. В условиях недостатка кислорода в ткани развивается дефицит макроэнергетических соединений, которые образуются в ходе реакций фосфорилирования, реализующихся на внутренних мембранах МХ и сопряженных с окислительно-восстановительными процессами [8, 11]. Подобные нарушения особо интенсивно влияют на ткани мозга, поскольку последние имеют особо высокие энергетические потребности и чувствительность к нарушениям энергопродукции. Наличие всего 20 % мутантной ДНК в МХ нейронов головного мозга может приводить к развитию выраженных функциональных нарушений в ЦНС; в то же время, например, в МХ гепатоцитов подобные изменения весьма ограничены даже при наличии 80 % мутантной ДНК [11, 12].

Структурные изменения МХ, связанные с гипоксией, начинаются с набухания и изменений электронномикроскопических характеристик мембран.

При тяжелой гипоксии (резком падении тканевого напряжения кислорода) значительно уменьшается количество крист в МХ, происходит интенсивная вакуолизация данных органелл и модулируется их морфогенез. Это может приводить к уменьшению либо увеличению общего количества МХ. Различают четыре основных направления, по которым происходят модификации МХ при тканевой гипоксии, – изменение количества и размеров МХ, образование так называемых мегаМХ, изменения формы МХ и модификации структуры крист. Эти процессы, происходящие изолированно или совместно, определяют конфигурационные энергозависимые состояния данных органелл – ортодоксальное, дезэнергизированное, энергизированное и так называемое энергизированно-скрученное. Данные сдвиги существенно влияют на активность синтетических процессов в клетке [10,13–15].

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению морфофункционального состояния МХ в нейронах, структурные изменения, происходящие в клеточных популяциях ствола головного мозга в период после пренатальной гипоксии, изучены недостаточно. Важность исследования данного отдела мозга определяется тем, что в его пределах находятся центры, контролирующие основные висцеральные функции жизнеобеспечения организма (сосудодвигательный центр, дыхательный центр, а также ядра черепно-мозговых нервов) [16, 17].

Целью нашей работы являлось определение морфофункционального состояния МХ и иммуногистохимических особенностей клеток ствола мозга у крысят – потомков самок, подвергнутых влиянию экспериментальной гипоксии в ходе беременности.

## МЕТОДИКА

Исследования были проведены на 20 крысятах (возраст один месяц, масса тела 30–35 г), родившихся от девяти самок линии Вистар. Животные были разделены на две группы – контрольную и экспериментальную; последняя, в свою очередь, включала в себя две подгруппы. В контрольную группу ( $n = 8$ ) входили крысята – потомки интактных беременных самок. Экспериментальные животные ( $n = 12$ ) в ходе внутриутробного развития подвергались гипоксическому воздействию (гипоксической гипоксии): животные первой подгруппы ( $n = 6$ ) – умерен-

ному, а второй ( $n = 6$ ) – тяжелому. Выбор возраста экспериментальных животных обусловлен тем, что именно к месячному возрасту у крысят в основном завершается постнатальная структурно-функциональная реорганизация клеточных популяций головного мозга и формируются большинство параметров его электрической активности [18].

Мы использовали экспериментальную модель гипоксии, разработанную в нашем отделе и адаптированную для изучения влияния неблагоприятных факторов на развитие плода и новорожденного [19]. Умеренную гипоксию создавали путем помещения самок в период от 15–17-го дня беременности вплоть до родов ежедневно на 2 ч в камеру с постоянным током газовой смеси, содержащей в себе 12 %  $O_2$  и 88 %  $N_2$ . Для создания тяжелой гипоксии использовали газовую смесь, содержащую в себе 7 %  $O_2$  и 93 %  $N_2$ . Камера была снабжена системой поглощения  $CO_2$ .

Критерием тяжести гипоксического состояния организма был уровень напряжения кислорода в артериальной крови животного ( $PaO_2$ ). Кровь отбиралась из хвостовой артерии; использовался газоанализатор OP-15 (Венгрия). Уровень  $PaO_2 \leq 75$  мм рт. ст. соответствовал умеренному, а  $PaO_2 \leq 50$  мм рт. ст. – тяжелому гипоксическому состоянию, которое сопровождается выраженной вторичной тканевой гипоксией [20].

Для проведения электронномикроскопических исследований у крысят обеих групп после декапитации, осуществляемой под слабым эфирным наркозом, отбирали образцы тканей ствола мозга на фронтальных уровнях от  $-9.68$  до  $-11.60$  относительно брегмы (согласно атласу Уотсона и Паксиноса) и немедленно фиксировали их, погружая забуференный 2.5 %-ный раствор глутаральдегида. Материал дополнительно фиксировали в реактиве Колфилда (на основе 2 %-ного раствора  $OsO_4$ , pH 7.4; «Sigma», США), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, абсолютных спирте и ацетоне и заливали в эпон-аралдит («Fluka», Швейцария) по общепринятой методике [21]. Изготавливали ультратонкие срезы (40–60 нм), которые контрастировали 1 %-ным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца («Sigma», США) по методике Рейнольдса [21].

Морфометрические и стереометрические исследования проводили, базируясь на подходах Уэйбела [22], с помощью компьютерной программы для морфометрических подсчетов ImageTool v. 3.0

(США). В каждом случае обследовали 130–150 тест-полей зрения; величина последних устанавливалась программно. Степень развития МХД оценивали, рассчитывая значения общего количества МХ на единице площади среза ( $n$ ), относительного количества поврежденных МХ ( $nd$ ), среднего диаметра МХ ( $d$ ) и интегрального значения поверхности МХ в единице объема ткани ствола мозга ( $Si_{tot}$ ). Электронномикроскопические изображения фрагментов нейронов (нейроцитов) и ненервных клеток (вероятно, глиоцитов) могли быть дифференцированы соответственно наличию синаптических специализаций в первых из них.

Интенсивности процессов апоптоза и митоптоза в клетках ствола мозга характеризовали, определяя экспрессию генов *CD95 APO-1/Fas* и *Bcl-2* с использованием иммуногистохимических методик. Для этого образцы ткани ствола мозга фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина, обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Изготовленные срезы окрашивали гематоксилин-эозином (по Ван-Гизону) и пикрофуксином («БликМедиклПродакшн», РФ) и исследовали с помощью светооптического микроскопа. Протокол подготовки препаратов [23] включал в себя депарафинизацию образцов, блокирование эндогенной пероксидазы 3 %-ным раствором перекиси водорода, блокирование неспецифических протеинов (обработку 1 %-ным бычьим сывороточным антигеном – BSA) с последующим промыванием фосфатным буфером (рН 7.4) и обработку срезов цитратным буфером (рН 6.0). После этого на срезы наносили первичные антитела к антигенам *CD95 APO-1/Fas* либо *Bcl-2* (на 1 ч),

вторичные антитела (на 30 мин), комплекс стрептавидин-пероксидазы (на 30 мин) и раствор АЕС-хромогена (5–20 мин до появления коричнево-красной окраски). Срезы дополнительно окрашивали гематоксилином Майера. Использовали реактивы от «ДАКО» (Дания), «Sigma» (США) и «БликМедиклПродакшн» (РФ).

Интенсивность реакции оценивали полуколичественно и выражали в баллах (от одного до трех) [24]. Для количественной оценки экспрессии генов *CD95 APO-1/Fas* и *Bcl-2* на нескольких участках срезов мозга, включающих в себя не менее 300 клеток, подсчитывали количество нейронов с положительной окраской цитоплазмы и нормировали это значение относительно общего количества просмотренных клеток [24, 25].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2007», определяя средние значения и ошибки среднего; межгрупповые сравнения производили, рассчитывая значения критерия  $\phi$  Фишера и критерия  $t$  Стьюдента (после проверки нормальности распределений числовых значений). Различия между средними величинами считали статистически значимыми при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

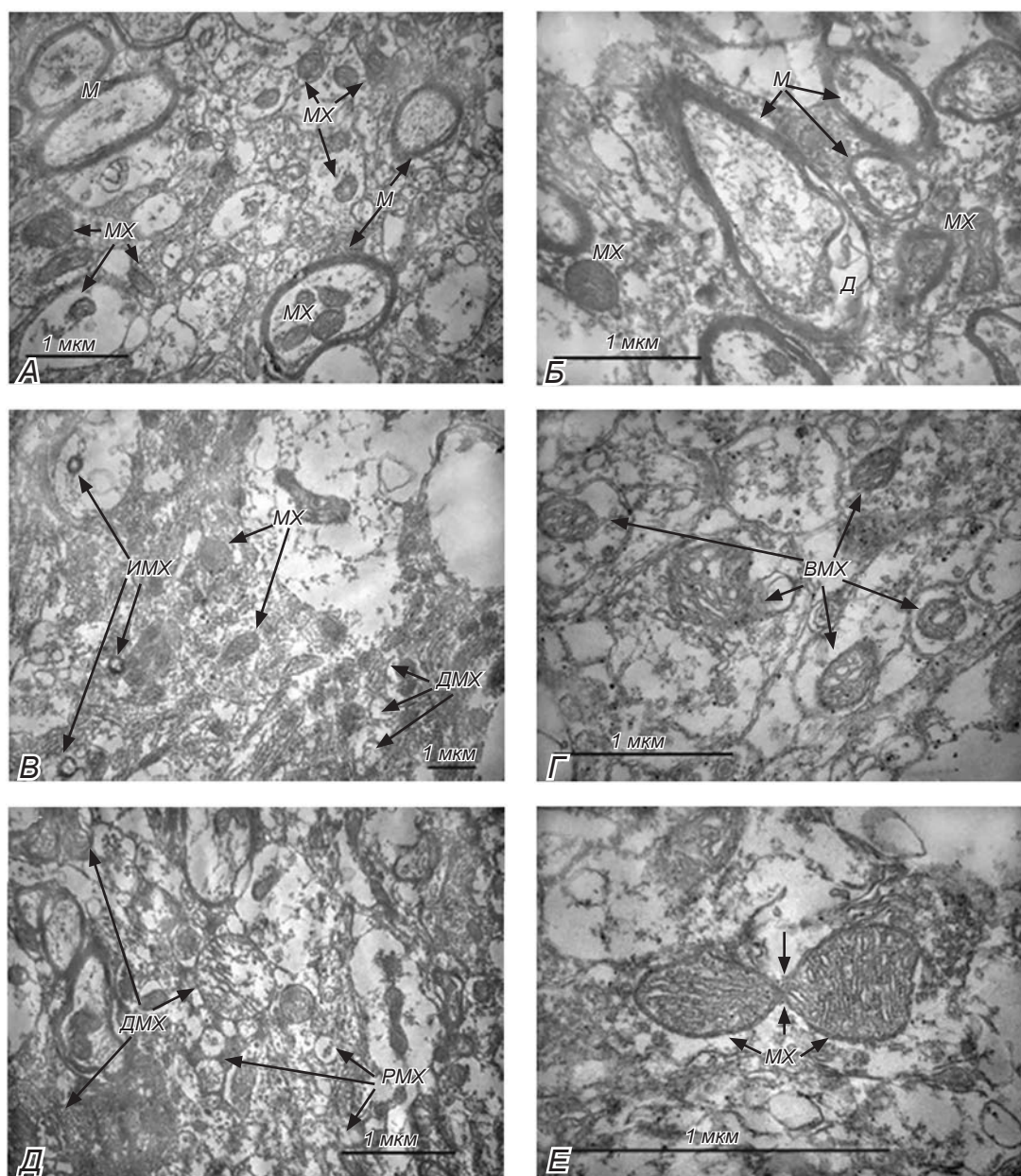
Через месяц после рождения в стволе мозга крысят, перенесших внутриутробно гипоксию различной степени тяжести, наблюдалось мозаичное разрушение миелина с деструкцией и проявлениями отека, более выраженное после тяжелого гипоксии-

### Влияние экспериментальной внутриутробной гипоксии на морфо- и стереометрические характеристики митохондрий (МХ) клеток ствола мозга у крысят ( $M \pm m, N = 150$ )

### Вплив експериментальної внутрішньоутробної гіпоксії на морфо- та стереометричні характеристики мітохондрій (МХ) клітин стовбура мозку у щурят ( $M \pm m, N = 150$ )

Группы животных	$n$ , ед/мкм <sup>2</sup>	$nd$ , %	$d$ , мкм	$Si_{tot}$ , мкм <sup>2</sup>
Первая группа ( $n = 8$ )	$14.5 \pm 0.5$	$2.1 \pm 0.4$	$0.20 \pm 0.02$	$3.9 \pm 0.3$
Вторая группа:				
первая подгруппа ( $n = 6$ )	$13.6 \pm 0.8$	$6.4 \pm 0.6^*$	$0.34 \pm 0.04^*$	$4.8 \pm 0.5^*$
вторая подгруппа ( $n = 6$ )	$8.0 \pm 0.6^* **$	$17.0 \pm 3.2^* **$	$0.47 \pm 0.02^* **$	$3.1 \pm 0.2^* **$

Примечания. \* $P < 0.05$  при сравнении с показателями первой контрольной группы; \*\* $P < 0.05$  при сравнении с показателями первой и второй подгрупп второй группы;  $N$  – количество полей для морфо- и стереометрических подсчетов;  $n$  – общее количество МХ на единице поверхности среза ткани ствола мозга;  $nd$  – относительное количество поврежденных МХ;  $d$  – средний диаметр МХ;  $Si_{tot}$  – сумма поверхностей МХ в единице объема ткани ствола мозга.



**Р и с. 1.** Ультраструктура клеток ствола мозга у крысят.

*А* – у контрольного животного; *Б* – нарушения структуры миелина после перенесенной тяжелой внутриутробной гипоксии; *В* – изменения ультраструктуры митохондрий (МХ) после тяжелой внутриутробной гипоксии; *Г* – изменения ультраструктуры МХ после внутриутробной гипоксии умеренной тяжести; *Д* – «структурный дистресс» МХ после тяжелой внутриутробной гипоксии; *Е* – процессы fission–fusion МХ после тяжелой внутриутробной гипоксии. МХ – митохондрии, М – миелин, Д – деструкция, ДМХ – деструкция МХ, ИМХ – инкапсуляция МХ, ВМХ – везикулярные МХ, РМХ – лизис МХ. На *Е* стрелками обозначен участок слияния – фрагментации МХ.

**Р и с. 1.** Ультраструктура клітин стовбура мозку у щурят.

ческого воздействия (рис. 1, *Б*). Считают, что подобные повреждения могут являться пусковым механизмом развития судорожной активности у новорожденных и детей [26].

Существенные изменения наблюдались также в митохондриальном аппарате как нейроцитов, так и нервных клеток (глиоцитов). Прежде всего, средние значения диаметра МХ у крысят первой и вто-

рой подгрупп достоверно превышали аналогичный показатель у контрольных животных (см. таблицу). Такие сдвиги могли быть обусловлены двумя основными причинами – набуханием МХ и изменениями их энергетического состояния. Согласно современным представлениям, набухание данных органелл может происходить как в результате возрастания проницаемости мембран МХ, так и благодаря конформационным перестройкам их матрикса, связанным с соответствующими изменениями энергетического метаболизма – активацией синтеза АТФ или гликолиза [27]. При этом следует отметить следующую особенность. У животных первой подгруппы превышение среднего значения диаметра МХ по сравнению с контролем составляло в среднем 70 %, что может быть связано в основном с переходом данных органелл в энергизированное состояние [10, 14]. У крысят второй подгруппы исследуемый показатель изменялся более чем в два раза. Подобный драматический сдвиг, видимо, в значительной степени соответствует необратимому набуханию МХ, тесно связанному с их деструкцией и гибелью по некротическому сценарию [10, 14].

Изменения такого показателя, как суммарная поверхность МХ в единице объема ткани, у крысят первой и второй подгрупп экспериментальной группы носили разнонаправленный характер. После умеренной внутриутробной гипоксии среднее значение  $Si_{tot}$  достоверно превышало контрольную величину, тогда как после тяжелой гипоксии этот показатель был достоверно меньшим (в обоих случаях  $P < 0.05$ ; см. таблицу). Обращает на себя внимание тот факт, что в нейронах крысят, перенесших тяжелую гипоксию (вторая подгруппа), общее количество МХ сокращалось почти вдвое, а суммарная их поверхность – лишь на 26 %. Следовательно, можно предположить, что основная часть МХ претерпевали необратимое набухание, и данные органеллы прекращали адекватно выполнять свою энергообеспечивающую функцию. У крысят первой подгруппы соотношение количества МХ, их среднего диаметра и суммарной поверхности было более-менее адекватным: у таких животных отмечалось умеренное (хотя и достоверное) увеличение  $d$  и  $Si_{tot}$  при сохранении стабильности общего количества МХ (см. таблицу). Мы полагаем, что именно существенное уменьшение значения  $Si_{tot}$  у крысят второй подгруппы отражает значительно более тяжелые (причем необратимые) изменения структуры МХ; это определяет кардинальные нарушения энер-

гетического метаболизма в нейронах ствола мозга данных экспериментальных животных. Основная функция МХ – энергетическая – обеспечивается работой ферментов дыхательной цепи МХ, связанных с их мембранами. Поэтому протяженность мембран МХ, отражающаяся в значении показателя  $Si_{tot}$ , является косвенным, но адекватным показателем способности МХ к обеспечению энергетического метаболизма клеток [22].

Дополнительным подтверждением данного вывода могут служить особенности изменений ультраструктуры МХ в клетках ствола мозга у крысят двух экспериментальных подгрупп. У этих животных, перенесших внутриутробно выраженную гипоксию, выявлялось значительное количество органелл с явными повреждениями структуры и/или находящихся в стадии деструкции (рис. 1, В). У крысят второй подгруппы количество таких МХ в нейронах достигало 17.0 % их общего количества. У крысят же первой подгруппы таких органелл было всего 6.4 % ( $P < 0.05$ ). Среди поврежденных МХ обнаруживалось множество так называемых везикулярных органелл, содержащих в себе тубуло-везикулярные кристы (Г). У крысят первой подгруппы степень набухания МХ была умеренной. Среди таких МХ отмечались органеллы с дугообразными и кольцевыми кристами, в ряде случаев устанавливаемыми анастомозы. Данный феномен принято рассматривать как свидетельство повышенной интенсивности энергетических процессов в клетках [14, 27]. В разрушающихся МХ у крысят второй подгруппы отмечались выраженная деструкция и дисконфлексация крист, нарушение целостности внутренней и/или наружной митохондриальных мембран. Во многих случаях наблюдался гидролиз остатков МХ, часто с их инкапсуляцией (В). Подобные изменения рассматриваются как один из возможных путей запуска апоптотической программы в клетках [14, 28].

Таким образом, результаты электронномикроскопических исследований указывали на развитие так называемого структурного дистресса МХ в клетках ствола мозга, прежде всего у крысят второй подгруппы. На фоне отсутствия «юных» форм этих органелл отмечались все стадии их гибели – от отека до полной диссипации, что подтверждает необратимость подобных структурных изменений (рис. 1, Д).

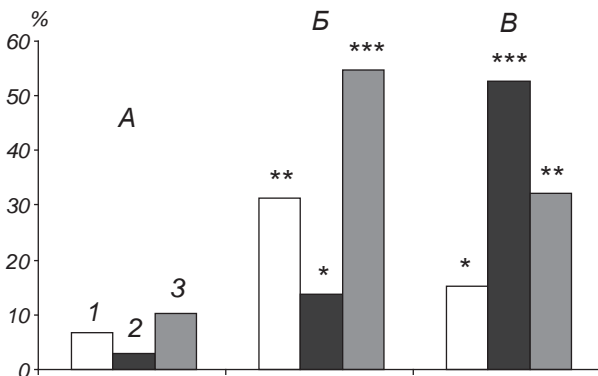
Широкий спектр нарушений ультраструктуры МХ у животных обеих экспериментальных подгрупп, подвергшихся внутриутробному воздей-

ствию гипоксии, требует дифференциации типов структурных модификаций данных органелл. Очевидно, следует выделить особенности структуры МХ, указывающие на наличие митоптоических и некротических изменений, а также изменений, направленных на сохранение адекватного характера энергетического метаболизма [29, 30]. При всем разнообразии наблюдаемых электронномикроскопических паттернов более половины изменений МХ у крысят первой подгруппы, видимо, следовало рассматривать как направленные на усиление компенсаторных возможностей митохондриального аппарата нейронов и нормализацию энергетических процессов, более 30 % – как признаки митоптоических изменений, и лишь незначительное количество структурных перестроек в МХ можно было отнести к некротическим (рис. 2). У животных же второй подгруппы картина ультраструктурных нарушений носила иной характер. Большинство (более 50 %) изменений следовало отнести к некротическим. Около 30 % сдвигов, очевидно, были направлены на поддержание метаболической способности митохондриального аппарата нейронов, и лишь немногим более 15 % следовало характери-

зовать как морфологические корреляты митоптоза МХ (рис. 2).

Следует также указать, что под влиянием внутриутробной гипоксии в нейронах происходила активация процессов слияния и фрагментации МХ (так называемых процессов *fission–fusion*), причем это более часто наблюдалось в мозгу крысят, перенесших тяжелую гипоксию (рис. 1, *E*). До настоящего времени сведения о поведении генетического материала МХ в ходе слияния и фрагментации последних были крайне ограниченными, однако показано, что ведущую роль в процессах *fission–fusion* играют белки, относящиеся к семейству GTP-связывающих (динаминов), а также актиновые микрофиламенты цитоскелета [31]. Как предполагают [31, 32], такие динамические процессы в митохондриальном аппарате при негативных воздействиях (в частности, при гипоксии) могут способствовать образованию большего количества мелких МХ и/или удлинению и «ветвлению» данных органелл; это облегчает процессы наработки и обмена энергии и направлено на поддержание адекватного энергетического метаболизма. С другой стороны, фрагментация МХ может приводить к изоляции поврежденных фрагментов хондриома от интактных органелл. Интенсификация обоих отмеченных процессов в митохондриальном аппарате клеток ствола мозга особо выражена именно при глубинных повреждениях МХ под воздействием тяжелой внутриутробной гипоксии.

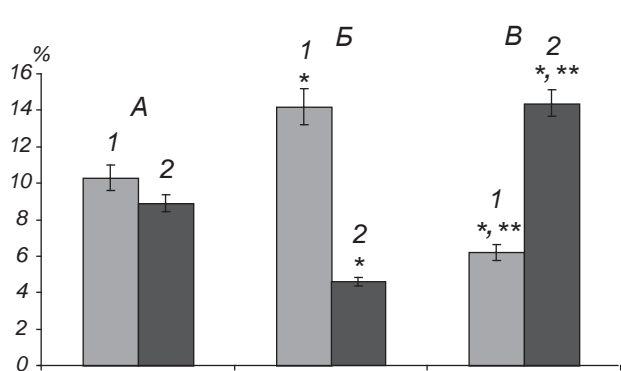
Несмотря на то что вопрос о ролях апоптоза и инициирующего его митоптоза в условиях гипоксии и ишемии мозга до настоящего времени остается дискуссионным, накапливается все больше фактов, свидетельствующих о высокой значимости этих процессов [26, 33]. Считается, что экспрессию *CD95 APO-1/Fas* можно рассматривать как ключевой фактор, определяющий генетическую программу клеточной смерти. Интенсивность экспрессии данного гена можно использовать для оценки апоптоза и его основных механизмов [34]. В наших экспериментах было выявлено, что индекс интенсивности экспрессии (ИИЭ) генов *CD95 APO-1/Fas* в клетках ствола мозга крысят после перенесенной умеренной внутриутробной гипоксии (первая подгруппа) достоверно более высок, чем аналогичный показатель после тяжелого гипоксического воздействия (вторая подгруппа) (рис. 3). У крысят первой подгруппы ИИЭ составлял  $14.3 \pm 1.2$ , что превосходило уровень контрольной группы на 38.8 % (ИИЭ



**Р и с. 2.** Количество структурных модификаций митохондрий (МХ) различных типов, нормированные относительно общего количества изменений в органеллах (%), в контрольной группе (А) и в первой (Б) и второй (В) подгруппах экспериментальной группы.

1 – митоптоические, 2 – некротические изменения; 3 – изменения, направленные на сохранение адекватного метаболизма. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  относительно контрольных величин.

**Р и с. 2.** Кількості структурних модифікацій мітохондрій різних типів, нормовані щодо загальної кількості змін в органеллах (%) у контрольній групі (А) і в першій (Б) та другій (В) підгрупах експериментальної групи.



**Р и с. 3.** Индексы интенсивности экспрессии маркеров митоза и апоптоза (генов *CD95 APO-1/Fas-1* и *Bcl-2-2*) в стволе мозга крысят первой (контрольной) группы (А) и первой (Б) и второй (В) подгрупп второй группы.  
\* $P < 0.05$  относительно контрольных величин; \*\* $P < 0.05$  при сравнении показателей в первой и второй подгруппах.

**Р и с. 3.** Індексi інтенсивності експресії маркерів мітоптозу та апоптозу (генів *CD95 APO-1/Fas-1* і *Bcl-2-2*) у стовбурі мозку щурів першої (контрольної) групи (А) та першої (Б) і другої (В) підгруп другої групи.

в контроле –  $10.3 \pm 0.7$ ). В то же время у крысят второй подгруппы данный показатель составлял  $6.8 \pm 0.3$ , т. е. был значительно (на 51.5 %) ниже, чем в контроле, а по сравнению с наблюдаемым в первой подгруппе был снижен более чем в два раза.

Подобные изменения свидетельствуют о более высокой готовности нейронов ствола мозга у животных первой подгруппы к апоптозу. Показано, что молекулы белка CD95, экспрессируемые на мембранах различных типов, участвуют в передаче апоптотического сигнала. При этом существование большого количества альтернативных форм растворимого Fas-белка позволяет предполагать, что начальные стадии апоптоза регулируются именно за счет модуляции экспрессии данного протеина [34–36].

ИИЭ гена *Bcl-2*, кодирующего соответствующий антиапоптотический протеин, в нейронах животных первой экспериментальной подгруппы был значительно более низким по сравнению с контрольным значением и составлял  $4.6 \pm 0.2$  (в контрольной группе –  $8.9 \pm 0.5$ , т. е. снижение составляло 48.3 %). У крысят второй подгруппы ИИЭ был равен  $14.3 \pm 0.8$ , что существенно (на 60.7 %) выше контрольного уровня и особенно (более чем в три раза) превышает аналогичную величину у животных первой подгруппы (рис. 3). Регуляция

апоптоза белками семейства *Bcl-2* (наряду с каспазами и проапоптотическими представителями протеинов семейств *Bax*, *Bad* и т. п.) осуществляется преимущественно в пределах митохондриального сигнального пути. Большое количество белков *Bcl-2*, постоянно экспрессируемых на внешних митохондриальных мембранах, контролируют апоптоз благодаря задействованию белков в формирование ионных каналов, а также выступают в роли адаптеров, связывающихся с белками, которые участвуют в процессе апоптоза [35, 37, 38]. Учитывая изложенное, можно заключить, что в клетках ствола мозга крысят, перенесших внутриутробно умеренное гипоксическое воздействие, возможность ингибирования митохондриального пути апоптоза снижается. Это согласуется с полученными в морфологических исследованиях данными о существенном увеличении количества митототически измененных МХ в нейронах ствола мозга именно у крысят первой подгруппы. И наоборот, для МХ животных, перенесших внутриутробно тяжелую гипоксию (вторая подгруппа), характерным является снижение способности к митоптозу, а для нейронов в целом – к апоптозу.

Предполагается, что апоптоз, наряду с активацией систем антиоксидантной защиты, регуляцией клеточного цикла и т. п., играет важную роль в реализации клеточных защитных реакций при неблагоприятных воздействиях на организм, в том числе при гипоксии [39]. Некоторые исследователи полагают, что именно селективная гибель клеток по сценарию апоптоза имеет решающее значение для формирования адаптационного ответа [40, 41]. В нейронах в условиях их адаптации к гипоксии включаются каскадные механизмы внутриклеточной сигнальной трансдукции, ответственные за экспрессию генов и формирование адаптационных феноменов, причем в том числе активизируются процессы апоптотической гибели этих клеток. В случае, когда наступает дезадаптация, в клетках накапливается значительное количество активных форм кислорода, и процессы, ответственные за инициирование и течение апоптоза, нарушаются. Это в настоящее время рассматривается как одна из основных причин развития патологических состояний [42]. По-видимому, как раз такая ситуация наблюдается у животных, перенесших тяжелую внутриутробную гипоксию.

Таким образом, результаты нашей работы позволяют констатировать, что в зависимости от степени тяжести пренатальной (внутриутробной) гипоксии



изменяются не только уровни экспрессии генов разнонаправленного действия, влияющих на выраженность митоптоза в клетках мозга, но и соотношение активности таких генов. В настоящее время доказано, что для регуляции ответа клетки на «сигналы смерти» соотношение влияний про- и антиапоптотических факторов имеет особое значение [35, 42]. После перенесенной умеренной внутриутробной гипоксии наблюдаются резкое повышение уровня экспрессии гена *CD95 APO-1/Fas* и параллельное снижение интенсивности экспрессии гена *Bcl-2*, в результате чего создаются благоприятные условия для активации процессов митоптоза и апоптоза. Эффект же действия тяжелой гипоксии является в значительной мере противоположным и сопровождается развитием выраженной митохондриальной дисфункции. У подобных особей это может приводить к формированию драматических митохондриальных расстройств и митохондриальных болезней в неонатальный период.

Полученные данные относительно влияния внутриутробно перенесенной гипоксии различной интенсивности на формирование структурно-функциональных изменений в МХ ствола мозга, видимо, могут быть учтены при разработке новых подходов к лечению митохондриальных болезней. Эффективность такого лечения на сегодняшний день является явно неудовлетворительной [26, 43]. Данная ситуация, очевидно, в значительной степени связана с тем, что комплекс специфических морфофункциональных и динамических нарушений в митохондриальном аппарате и изменений соотношения структурных модификаций МХ, обусловленных экспрессией факторов генетической программы клеточной смерти, пока не учитывается или учитывается недостаточно.

Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986), и с принципами Хельсинкской Декларации (2000).

Авторы данной работы – Е. В. Розова, В. И. Похилько, Н. Г. Сидорьяк и М. Г. Дубовая – подтверждают отсутствие конфликтов любого рода, касающихся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием, а также взаимоотношений соавторов статьи.

К. В. Розова<sup>1</sup>, В. И. Похилько<sup>2</sup>, Н. Г. Сидорьяк<sup>3</sup>, М. Г. Дубова<sup>1</sup>

#### СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В МІТОХОНДРІЯХ КЛІТИН СТОВБУРА МОЗКУ У ЩУРЯТ, ЩО ПЕРЕНЕСЛИ ВНУТРІШНЬОУТРОБНУ ГІПОКСІЮ

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

<sup>2</sup>Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», Полтава (Україна).

<sup>3</sup>Міжвідомча наукова лабораторія медико-біологічного моніторингу Мелітопольського державного педагогічного університету ім. Богдана Хмельницького і Таврійської державної агротехнічної академії, Мелітополь (Україна).

#### Резюме

Досліджували зміни стану мітохондрій (МХ) та імуногістохімічні особливості клітин стовбура мозку у щурят, котрі зазнали дії експериментальної пренатальної гіпоксії різного ступеня – помірної і тяжкої (дихання вагітних самоць газовими сумішами O<sub>2</sub> та N<sub>2</sub>, які вміщували 12 і 7 % O<sub>2</sub> відповідно). У 20 одномісячних щурят – нащадків самоць, яких піддавали гіпоксії, та контрольних самоць досліджували ультраструктурні характеристики МХ клітин стовбура мозку, а також імуногістохімічно визначали експресію генів *CD95 APO-1/Fas* і *Bcl-2*, котрі модулюють інтенсивність апоптозу та митоптозу в цих клітинах. Тяжка внутрішньо-утробна гіпоксія зумовлювала розвиток «структурного дистресу» МХ клітин стовбура мозку; у багатьох МХ спостерігалися всі стадії деструкції (від набряку до повного лізису), а «юні» форми даних органел були відсутніми. Виявлялося мозаїчне руйнування мієліну з деструкцією та проявами набряку. Після внутрішньоутробної гіпоксії помірного ступеня більше половини змін ультраструктури МХ можна було кваліфікувати як спрямовані на підвищення компенсаторних можливостей мітохондріального апарату нейронів. Після помірної пренатальної гіпоксичної дії рівні експресії генів *CD95 APO-1/Fas* і *Bcl-2* в нейронах стовбура мозку свідчили про підвищену готовність нейронів до апоптозу та зниження можливості інгібування його мітохондріального шляху. В той же час для МХ тварин, котрі перенесли внутрішньоутробно тяжку гіпоксію, було характерно зниження здатності до митоптозу; в нейронах спостерігалися апоптотичні зміни. Отримані результати щодо впливу пренатальної гіпоксії різної інтенсивності на формування структурно-функціональних змін у МХ стовбура мозку можуть слугувати підґрунтям для розробки нових підходів до лікування мітохондріальних захворювань.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Э. Л. Германова, *Нарушения энергетического обмена при гипоксии и их коррекция с помощью сукцинатсодержащего соединения проксипин*, Дис. ... канд. биол. наук, Москва (2008).
2. Л. Д. Лукьянова, "Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции", *Патол. физиология и эксперим. терапия*, № 1, 3-19 (2011).
3. Т. К. Знаменська, В. І. Похилько, О. М. Ковальова та ін., "Зміни нейронитів стовбура головного мозку у щурят в умовах експериментальної моделі гіпоксії та при нейропротекторній корекції", *Лікар. справа*, № 3/4, 75-84 (2009).
4. Ю. И. Барашнев, *Перинатальная неврология*, Триада-Х, Москва (2001).
5. D. A. Rossignol and J. J. Bradstreet, "Evidence of mitochondrial dysfunction in autism and implications for treatment," *Am. Biochem. Biotechnol.*, 4, No. 2, 208-217 (2008).
6. L. Palmieri and A. M. Persico, "Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: cause or effect?" *Biochem. Biophys. Acta*, 1797, Nos. 6/7, 1130-1137 (2010).
7. M. Dhar-Mascareno and J. M. Castramo, "Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells," *Free Radical Biol. Med.*, 38, No. 10, 1548-1554 (2005).
8. А. А. Селин, Н. В. Лобышева, О. Н. Воронцова и др., "Механизм действия глицина как протектора нарушения энергетики тканей мозга в условиях гипоксии", *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, 153, № 1, 52-55 (2012).
9. Ю. А. Владимиров, "Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клетки", *Сорос. образоват. журн.*, 6, № 9, 2-9 (2000).
10. Ю. В. Судакова, Л. Е. Бакеева, В. Г. Цыпленкова, "Энергозависимые изменения ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов человека при алкогольном поражении сердца", *Арх. патологии*, 61, № 2, 15-20 (1999).
11. Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина, М. Н. Бизенкова, "Молекулярно-клеточные механизмы цитотоксического действия гипоксии. Патогенез гипоксического некробиоза", *Соврем. наукоемкие технологии*, № 7, 32-40 (2006).
12. Т. К. Знаменська, В. І. Похилько, О. М. Ковальова та ін., "Морфофункціональні зміни мітохондрій нейронитів стовбура мозку щурів в умовах експериментальної моделі гіпоксії та їх корекція Церebroкуруином® та Ліпіном", *Перинатология и педиатрия*, 28, № 4, 83-86 (2006).
13. К. М. Резников, "Общие механизмы формирования ответных реакций организма на воздействие факторов окружающей среды", в кн.: *Прикладные информационные аспекты медицины*, Т. 1, Би., Воронеж (1998), с. 4-9.
14. Ю. В. Судакова, Л. Е. Бакеева, В. Г. Цыпленкова, "Деструктивные изменения митохондрий кардиомиоцитов человека при алкогольном поражении сердца", *Арх. патологии*, 61, № 9, 19-23 (1999).
15. M. Karbowski and R. J. Youle, "Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis," *Cell Death Different.*, 10, No. 10, 870-880 (2003).
16. R. Almini, T. J. Levy, V. N. Han, et al, "BDNF protect against spatial memory deficit following neonatal hypoxia-ischemia," *Exp. Neurol.*, 166, No. 1, 99-114 (2000).
17. И. З. Пинигина, *Структурная характеристика ядер ствола головного мозга белых крыс в постнатальном онтогенезе в норме и после внутриутробной гипоксии*, Дис. ... канд. мед. наук, Тюмень (2009).
18. А. Д. Ноздрачев, *Анатомия крысы*, Лань, СПб. (2001).
19. В. І. Похилько, К. В. Розова, "Морфологічні зміни мембран мітохондрій нейронитів у щурят в умовах експериментальної моделі гіпоксії", *Вісн. Укр. мед. стоматолог. акад.*, 9, № 2, 109-112 (2009).
20. *Вторичная тканевая гипоксия*, под ред. А. З. Колчинской, Наук. думка, Киев (1983).
21. В. Я. Карупу, *Электронная микроскопия*, Вища шк., Киев (1984).
22. К. Ташке, *Введение в количественную цитогистологическую морфологию*, Изд-во Акад. СРР, Бухарест (1980).
23. Е. Р. Полосухина, А. Ю. Барышников, Ю. В. Шишкин, "Исследование экспрессии Fas(APO-1/CD95), опосредующего апоптоз, с помощью моноклональных антител", *Гематология и трансфузиология*, № 4, 3-6 (2000).
24. E. Kondo, S. Nakamura, C. Milliman, et al., "Detection of bcl-2 protein and bcl-2 messenger RNA in normal and neoplastic lymphoid tissues by immunohistochemistry and *in situ* hybridization," *Blood*, 80, No. 8, 2044-2051 (1992).
25. G. Siciliano, L. Volpi, S. Piazza, et al., "Functional diagnostics in mitochondrial diseases," *Biosci. Report*, 27, Nos. 1/3, 53-67 (2007).
26. И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник и др., *Рациональная нейропротекция*, Изд. А. Ю. Заславский, Донецк (2009).
27. Ю. Е. Вельтишев, *Место и значение нарушения биоэнергетики организма в патологии детского возраста. Клинические и патогенетические проблемы нарушений клеточной энергетики (митохондриальная патология)*, Медицина, Москва (1999).
28. В. Н. Залесский, Н. В. Великая, "Механизмы цитотоксических эффектов активных молекул кислорода и развитие апоптоза", *Соврем. пробл. токсикологии*, № 1, 11-17 (2003).
29. В. Н. Манских, "Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза", *Бюл. сибир. медицины*, № 1, 63-70 (2004).
30. Е. В. Розова, "Изменения морфофункционального состояния митохондрий клеток тканей легких и сердца крыс при гипоксии различного генеза", *Журн. Акад. мед. наук Украины*, 14, № 4, 752-765 (2008).
31. В. Ю. Поляков, М. Ю. Сухомлинова, Д. Файс, "Как сливаются, фрагментируются и делятся митохондрии", *Биохимия*, 68, № 8, 1026-1039 (2003).
32. V. P. Skulachev, L. E. Bakeeva, B. V. Cherniyak, et al., "Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis," *Mol. Cell Biochem.*, 256/257, Nos. 1/2, 341-358 (2004).
33. Е. В. Владимирская, "Механизмы апоптотической гибели клеток", *Гематология и трансфузиология*, 47, № 2, 35-40 (2002).
34. M. Muschen, U. Warskulat, and M. W. Beckmann, "Defining CD95 as a tumor suppressor gene," *J. Mol. Med.*, 78, No. 6, 312-325 (2000).
35. С. В. Рыжов, В. В. Новиков, "Молекулярные механизмы апоптотических процессов", *Рос. биотерапевт. журн.*, 1, № 3, 5-11 (2002).

36. R. C. Budd, "Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis," *J. Clin. Invest.*, **109**, No. 4, 437-442 (2002).
37. Т. С. Запорожец, К. В. Майстровский, В. Г. Раповка и др., "Роль Т-клеточной дисфункции в развитии атеросклероза сосудов нижних конечностей и возможности ее коррекции", *Тихоокеан. мед. журн.*, № 3, 100-105 (2009).
38. H. Walczak and P. H. Krammer, "The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis system," *Exp. Cell Res.*, **256**, No. 1, 58-66 (2000).
39. А. В. Аклев, Л. Ю. Крестинина, Т. А. Варфоломеева и др., "Адаптивные способности лимфоцитов крови у жителей Южного Урала, подвергшихся хроническому облучению", *Радиационная биология. Радиоэкология*, **44**, № 4, 426-431 (2004).
40. И. А. Бондарчук, "Анализ роли репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза в радиационно-индуцированном адаптивном ответе клеток млекопитающих", *Радиационная биология. Радиоэкология*, **43**, № 1, 19-28 (2003).
41. Г. Д. Засухина, "Механизмы защиты клеток человека, связанные с генетическим полиморфизмом", *Радиационная биология. Радиоэкология*, **45**, № 4, 520-535 (2005).
42. А. А. Ярилин, "Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии", в кн.: *Актуальные проблемы патофизиологии*, под ред. Б. Б. Мороза, Медицина, Москва (2001), с. 13-56.
43. S. Parikh, R. Saneto, M. J. Faulk, et al., "A modern approach to the treatment of mitochondrial disease," *Current Treat. Options Neurol.*, **11**, No. 6, 414-430 (2009).