

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

НИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ

имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

На правах рукописи

Эльдаров Чупалав Максудович

**ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ.
УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в отделе биоэнергетики НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель:

Вайс Валерия Борисовна, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

ЦЫПЛЕНКОВА Валерия Герасимовна, доктор медицинских наук, профессор ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, кафедра морфологии медико-биологического факультета, профессор кафедры

СМИРНОВА Елена Александровна доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, кафедра клеточной биологии и гистологии, профессор кафедры

БАРАНОВА Екатерина Николаевна, кандидат биологических наук, ФГБНУ ВНИИСБ, кафедра клеточной биологии, ведущий научный сотрудник.

Защита диссертации состоится «19» декабря 2017 г. в 17.00 на заседании диссертационного совета МГУ.03.09 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119899, Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12, Биологический факультет МГУ, аудитория М-1

Сайт: www.bio.msu.ru

E-mail: info@mail.bio.msu.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА».

Автореферат разослан « » ноября 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук



Калистратова Е.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Процесс старения – одна из наиболее давних и острых биологических проблем, не теряющая своей актуальности со временем. Было предложено множество различных теорий, описывающих молекулярные, цитологические, генетические и эволюционные факторы старения. Одной из общепринятых теорий является свободнорадикальная теория Хармана, который предположил, что ведущую роль в процессах старения играет окислительное повреждение клеток свободными радикалами, в том числе активными формами кислорода (АФК), являющимися побочным продуктом процесса клеточного дыхания. В.П. Скулачѳв постулировал, что последним рубежом защиты клетки от разрушительного действия АФК является самоликвидация митохондрий – “митоптоз”. За последние десятилетия была доказана важная роль АФК и дисфункции митохондрий в развитии таких распространенных возрастных патологий, как ишемическая болезнь сердца, многие годы являющаяся главной причиной смертности в мире, саркопения и синдром “сухого глаза”, серьезно ухудшающие качество жизни в старости. Одним из перспективных методов терапии подобных старческих заболеваний является применение антиоксидантов. Учитывая центральную роль митохондрий в образовании АФК, особый интерес представляет собой изучение возможных эффектов митохондриально-направленных антиоксидантов, таких, как SkQ1. Для оценки эффективности действия SkQ1, помимо крыс Wistar, удобной моделью является линия крыс OXYS, полученная из крыс Wistar. Данная линия крыс характеризуется особой чувствительностью к катарактогенному эффекту галактозы и преждевременным старением.

Другим направлением исследования старения является изучение организмов, имеющих экстремально высокую продолжительность жизни по сравнению с ожидаемой для своей массы. К таким животным относятся, в частности, аксолотль и протей, однако наибольший интерес вызывает голый землекоп (*Heterocephalus glaber*), небольшой грызун с эусоциальной организацией, который характеризуется целым рядом уникальных признаков. Получено множество свидетельств замедленного старения у голого землекопа. Изучение механизмов, обеспечивающих уникальные признаки *H. glaber* и других долгоживущих животных, играет важную роль в разработке новых методов продления жизни.

Несмотря на наличие большого количества современных молекулярных, биохимических и гистологических методов, в исследованиях возраст-зависимых патологических изменений, особенно процессов, протекающих в митохондриях, одна из главных ролей принадлежит электронной микроскопии, поскольку изменения ультраструктуры органелл клетки можно наблюдать задолго до проявления патологических изменений на биохимическом, физиологическом или поведенческом уровне. Споры о необъективности результатов электронно-микроскопического исследования призвана разрешить морфометрия, которая позволяет получить объективные цифры основных параметров наблюдаемых структур, такие как длина, ширина, площадь поверхности, объѳменная доля и другие, используя методы стереологии для описания свойств трехмерных фигур по их двумерным срезам. Современные графические редакторы в значительной степени автоматизируют и упрощают процесс изображений, что открывает новые возможности для развития цитологических и ультраструктурных исследований, в том числе методами электронной микроскопии.

Цель исследования. Выявление возраст-зависимых закономерностей преобразования ультраструктуры митохондриального аппарата клетки на различных экспериментальных моделях.

Задачи исследования.

1. Установить закономерности преобразования ультраструктуры митохондриального аппарата поперечно-исчерченной мышечной ткани в условиях нормального физиологического старения у крыс Wistar, преждевременного старения у крыс OXYS, а также старения при воздействии митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 у крыс Wistar и OXYS.
2. Исследовать изменения ультраструктуры митохондриального аппарата поперечно-исчерченных мышц у голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) с возрастом и провести сравнительный анализ с результатами исследования поперечно-исчерченных мышц у мышцей C57BL\6.
3. Исследовать изменение ультраструктуры слезной железы в условиях нормального физиологического старения у крыс Wistar, в условиях преждевременного старения у крыс OXYS, а также старения при воздействии митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 у крыс Wistar и OXYS.

Научная новизна работы. Впервые проведено ультраструктурное и морфометрическое исследование закономерностей изменения общей структуры хондриома мышечной ткани при старении на различных экспериментальных моделях. Разработанный метод морфометрического анализа позволил охарактеризовать изменения внутренней ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов при старении на различных экспериментальных моделях. Впервые исследованы закономерности изменения общей структуры хондриома кардиомиоцитов голого землекопа (*H. glaber*) в возрасте 6 месяцев и 5 лет, а также, методом морфометрического анализа, охарактеризованы особенности внутренней организации митохондрий кардиомиоцитов голого землекопа (*H. glaber*) в возрасте 6 месяцев и 5 лет. Впервые показано отсутствие митохондриального ретикулума в скелетной мышце у *H. glaber* в возрасте 6 месяцев и описаны преобразования митохондриального аппарата скелетной мышцы голого землекопа (*H. glaber*) с возрастом, ранее не известные для данной ткани. Впервые на ультраструктурном уровне проведено исследование изменения структуры ацинарных клеток и протоков слезной железы при старении, доказано замещение ацинусов протоками, а также проведена морфометрическая оценка электронно-микроскопических препаратов и исследованы изменения в ультраструктуре митохондрий ацинарных клеток слезной железы с возрастом. Впервые на ультраструктурном уровне показано, что митохондриальный антиоксидант SkQ1 снижает степень возраст-зависимых изменений ультраструктуры ткани миокарда, скелетной мышцы и слезной железы. Показаны локальные участки разбора ядерной оболочки в кардиомиоцитах на всех исследованных моделях, как у возрастных, так и у молодых животных, что подтверждает литературные данные о динамической перестройке ядерной оболочки.

Практическая значимость работы. Результаты диссертации имеют важное значение как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Полученные данные о динамике изменений ультраструктуры митохондрий на различных моделях старения подтверждают предположения свободнорадикальной и митохондриальной теорий о важнейшей роли митохондрий в развитии возраст-зависимых патологических изменений. Выявленные особенности ультраструктуры митохондрий *H. glaber* могут

являться одним из факторов экстремальной продолжительности жизни этого животного. Обнаруженные нами в кардиомиоцитах случаи расположения митохондрий в ядре могут свидетельствовать о более сложном характере митохондриально-ядерных взаимодействий, чем предполагалось ранее. Результаты исследования действия SkQ1 позволяют говорить о том, что использование антиоксидантов, в том числе митохондриально-направленных, является одним из эффективных методов терапии возрастных заболеваний в тканях скелетной мышцы и слезной железы и имеет хорошие перспективы для внедрения в клинической практике.

Апробация результатов работы. Результаты работы были представлены в форме устных и стендовых докладов на ряде российских и международных конференций: XIX международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" (Москва, 2012); международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" (Пушино, 2011, 2012, 2017); XXVI Российской конференции по электронной микроскопии и в рамках Конференции 4-й Школе молодых учёных «Современные методы электронной и зондовой микроскопии в исследованиях наноструктур и наноматериалов, (Москва, 2016).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 2 статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК, 2 статьи в иностранных рецензируемых журналах, 6 тезисов докладов и материалов конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 235 страницах, иллюстрирована 151 рисунком и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Библиография включает 231 источник.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Животные. Исследование было проведено на крысах Wistar и OXYS в возрасте от 3 до 24 месяцев, мышах C57BL/6 в возрасте от 2,5 до 30 месяцев, а также голых землекопах (*Heterocephalus glaber*) в возрасте от 6 до 60 месяцев. Для исследования действия SkQ1 часть крыс получала препарат с едой в концентрации 250 нмоль\кг: для исследования поперечно-исчерченной мышцы - в течение 5 месяцев ежедневно с 19 месяцев; для исследования слезной железы – ежедневно, начиная с 1,5 месяцев.

Электронная микроскопия. Подготовка препаратов для электронной микроскопии выполнялась общепринятым способом, съемка проводилась на микроскопах Hitachi h-12 и JEOL JEM-1400.

Морфометрический анализ и статистическая обработка данных.

1. Для исследования поверхностной плотности внутренней мембраны митохондрий отбиралось по 50 снимков для каждой группы животных, на увеличении более $\times 10000$, после чего в графическом редакторе вручную выделялась внутренняя мембрана митохондрий и, с помощью стереологических преобразований, рассчитывалась поверхностная плотность.

2. Для исследования количества сечений, площади и объемной доли митохондрий в сердце и скелетной мышце было отобрано и обработано по 20 снимков на увеличении $\times 1500$ для каждой группы животных.

3. Количество ацинусов и протоков в ткани слезной железы определялось методом прямого подсчета количества сечений непосредственно на микроскопе. В качестве

единицы площади была взята величина $0,23 \text{ мкм}^2$, обусловленная особенностями электронного микроскопа.

Для статистического анализа с помощью критериев Шапиро-Уилкса и Колмогорова-Смирнова была проверена нормальность распределения каждого параметра и получены значения среднего, а также стандартная ошибка среднего. Наличие статистически значимой разницы определялось с помощью статистического критерия Манна-Уитни при уровне надежности $p=0,05$. Все вычисления были проведены в программе STATISTICA 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Возраст-зависимые изменения митохондрий миокарда. В ткани миокарда крыс и мышей, при нормальном физиологическом старении, показаны прогрессирующие нарушения структуры хондриома, а также внутренней организации митохондрий, на что также указывает целый ряд морфометрических параметров. Так, у крыс Wistar в возрасте 3 месяцев и мышей C57BL/6 в возрасте 2,5 месяцев количество сечений митохондрий составило $0,52 \pm 0,03$ и $0,53 \pm 0,028$ шт. на 1 мкм^2 кардиомиоцита, средняя площадь одного сечения – $0,87 \pm 0,05$ и $0,85 \pm 0,038 \text{ мкм}^2$, а объемная доля митохондрий – $39,47 \pm 3,9\%$ и $44,97 \pm 0,7\%$ соответственно (рис. 1). С возрастом (в 24 месяца) у крыс Wistar количество сечений митохондрий на единицу площади уменьшилось до $0,37 \pm 0,032$ шт., средняя площадь одного сечения, напротив, увеличилась до $1,00 \pm 0,052 \text{ мкм}^2$, объёмная доля митохондрий изменилась мало – $35,68 \pm 3,4\%$ (рис. 1). У 30-месячных мышей C57BL/6 произошли аналогичные изменения: число сечений митохондрий составило $0,41 \pm 0,028$ шт./ мкм^2 , средняя площадь сечения – $1,05 \pm 0,050 \text{ мкм}^2$, объемная доля митохондрий – $42,45 \pm 1,6\%$ (рис. 1). Таким образом, при нормальном физиологическом старении показано статистически достоверное (на уровне $p < 0,05$) снижение количества сечений митохондрий при одновременном увеличении их размеров.

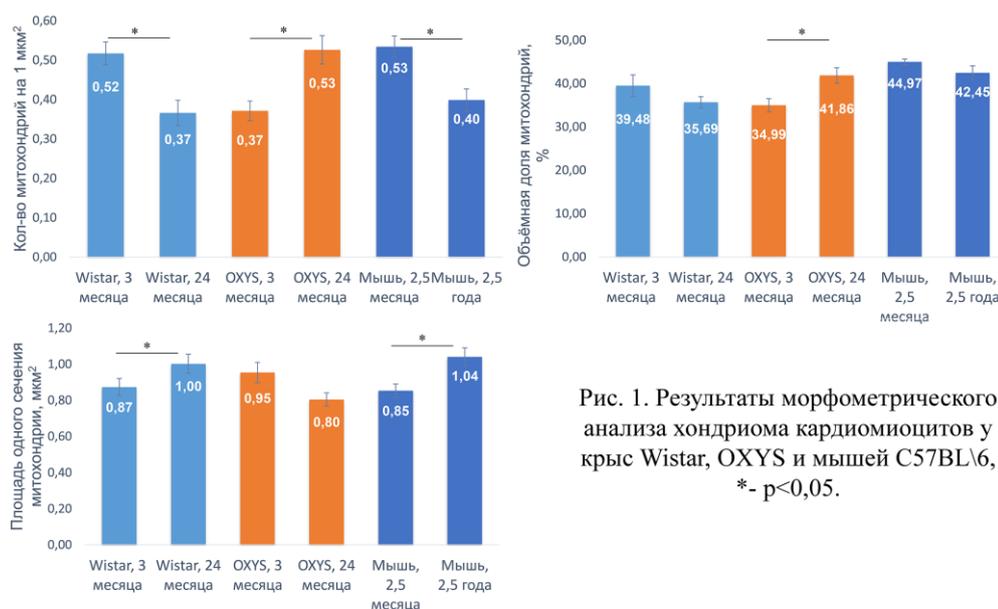


Рис. 1. Результаты морфометрического анализа хондриома кардиомиоцитов у крыс Wistar, OXYS и мышей C57BL/6, *- $p < 0,05$.

В то время как суммарная объемная доля хондриома с возрастом изменяется незначительно, внутренняя ультраструктура митохондрий претерпевает выраженные изменения: резко снижается количество крист, они теряют взаимопараллельное

расположение и не заполняют полностью внутреннее пространство митохондрий, вследствие чего в матриксе митохондрий появляются обширные электронно-светлые области (рис. 2Б). Степень этих изменений хорошо иллюстрирует такой стереологический параметр, как площадь поверхности внутренней мембраны митохондрии на единицу объема митохондрии, или **поверхностная плотность** внутренней мембраны. У крыс Wistar и мышей C57BL\6 показано практически двукратное снижение поверхностной плотности внутренней мембраны с возрастом - с $41,3 \pm 1,51$ до $21,47 \pm 1,22$ мкм²/мкм³ и с $37,53 \pm 1,52$ до $20,54 \pm 1,19$ мкм²/мкм³ (рис. 3, рис. 5 соответственно).

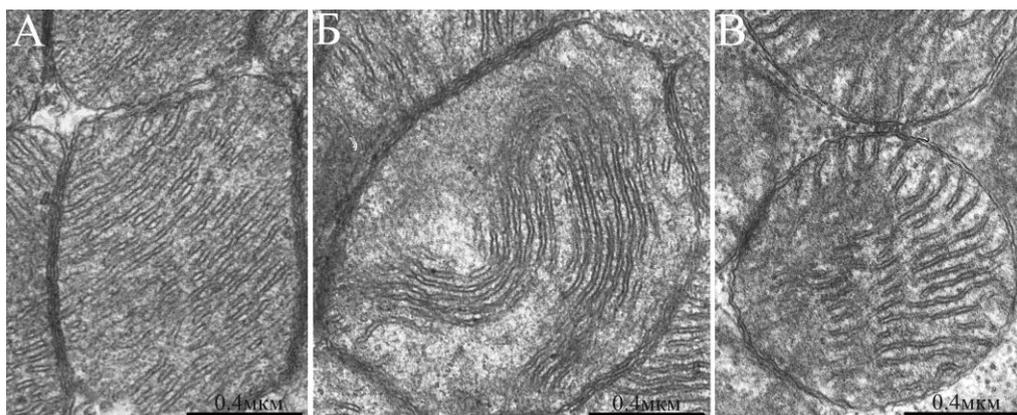
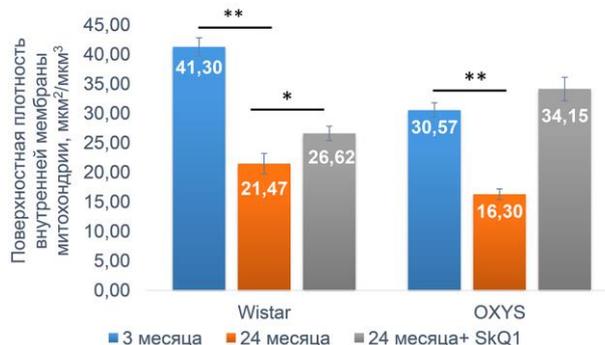


Рис. 2. Особенности внутренней ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов крыс Wistar: А - в возрасте 3 месяцев; Б - в возрасте 24 месяцев; В - в возрасте 24 месяцев, получавших SkQ1 в концентрации 250 нмоль\кг в ежедневно с 19 месяцев.

Рис. 3. Площадь поверхности внутренней мембраны на единицу объема митохондрии у крыс Wistar и OXYS в возрасте 3 и 24 месяцев, получавших и не получавших препарат SkQ1; *- $p < 0,05$;



На модели преждевременного старения, вызванного повышенным окислительным стрессом – у крыс OXYS – патологические изменения хондриома и ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов более выражены и развиваются в раннем возрасте. В отличие крыс и мышей, у которых при нормальном физиологическом старении происходило снижение количества и увеличение размеров митохондрий, у крыс OXYS численность митохондрий возрастала, наряду с уменьшением их среднего размера. Визуальные наблюдения подтверждает и морфометрический анализ: количество сечений митохондрий на 1 мкм² кардиомиоцитов у OXYS увеличилось с возрастом - с $0,37 \pm 0,025$ шт. в возрасте 3 месяцев, до $0,53 \pm 0,036$ шт. в возрасте 24 месяцев, средняя площадь при этом снизилась с $0,95 \pm 0,056$ до $0,80 \pm 0,037$ мкм². В сумме эти изменения привели к увеличению объемной доли митохондрий с $35 \pm 1,5$ до $42 \pm 1,8\%$. Все изменения статистически достоверны. ($p < 0,05$) (рис. 1).

Наиболее значительные возраст-зависимые изменения у крыс OXYS также, как и у крыс контрольной группы Wistar, происходят во внутренней ультраструктуре митохондрий кардиомиоцитов. Уже в возрасте 3 месяцев в большей части митохондрий появляются первые признаки нарушения внутренней организации. В отдельных участках органелл кристы теряют плотную взаимопараллельную ориентацию, между ними начинают появляться свободные участки, лишённые мембранных структур и заполненные веществом низкой электронной плотности (рис. 4А). Таким образом, по внутренней ультраструктуре митохондрии крыс OXYS в возрасте 3 месяцев сравнимы с таковыми у крыс Wistar в возрасте 24 месяца. В возрасте 24 месяцев в митохондриях кардиомиоцитов крыс OXYS внутренняя мембрана митохондрии образует лишь единичные кристы, упорядоченность которых сохраняется только в отдельных участках органелл. Области, заполненные веществом низкой электронной плотности, занимают большую часть митохондрии (рис. 4Б).

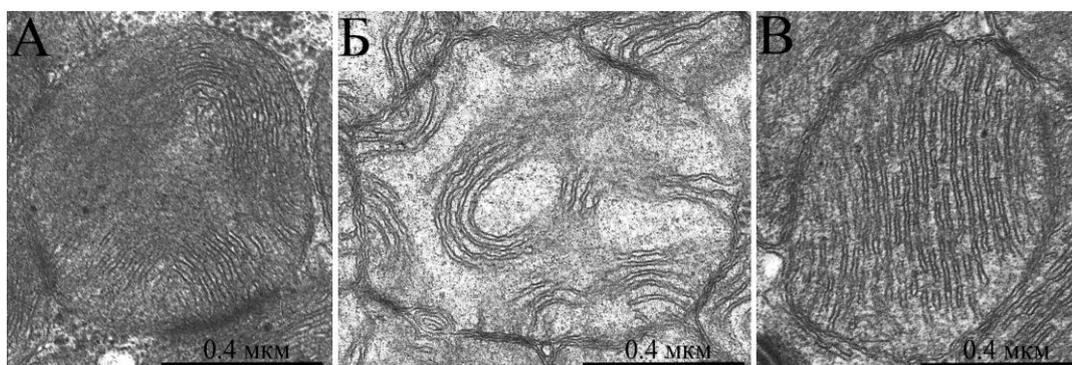


Рис. 4. Особенности внутренней ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов крыс OXYS: А - в возрасте 3 месяцев; Б - в возрасте 24 месяцев; В - в возрасте 24 месяцев, получавших SkQ1 в концентрации 250 нмоль\кг в ежедневно с 19 месяцев.

Морфометрический анализ внутренней ультраструктуры митохондрий крыс OXYS показал резкое снижение поверхностной плотности внутренней мембраны митохондрий с возрастом – с $30,57 \pm 1,74$ до $16,3 \pm 0,89$ мкм²/мкм³ (рис. 3). Примечательно, что уже в 3 месяца у крыс OXYS поверхностная плотность внутренней мембраны митохондрии снижена на треть по сравнению с крысами Wistar и мышами C57BL\6 аналогичного возраста. Нетипичные изменения хондриома с возрастом у OXYS, возможно, объясняются очень ранними сроками начала патологических изменений в тканях этой линии животных, когда 3-месячное животное уже не может являться адекватным контролем. Аналогичные изменения ранее уже были описаны в литературе при развитии патологий сердца.

Исследование действия митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 выявило защитный эффект препарата, выраженный в значительном снижении степени деструктивных изменений ультраструктуры митохондрий с возрастом. Эффект антиоксиданта проявлялся как при нормальном физиологическом старении, так и при старении в условиях повышенной генерации АФК, где его действие более эффективно. Так, у крыс Wistar и OXYS в возрасте 24 месяцев, принимавших SkQ1 в концентрации 250 нмоль\кг ежедневно в течение 5 месяцев, внутреннее пространство митохондрий заполнено взаимопараллельными рядами крист, расположение и форма которых соответствуют активному, энергизованному состоянию (рис. 2В и рис. 4В, соответственно). Поверхностная плотность внутренней мембраны митохондрии

составила $26,62 \pm 0,91$ мкм²/мкм³ у крыс Wistar и $34,15 \pm 1,21$ мкм²/мкм³ у крыс OXYS, что на 24 и 106% больше чем у контрольных 24-месячных животных, не получавших SkQ1 (рис. 3). Полученный результат позволяет сделать вывод о том, что уровни окислительного стресса являются одним из важных факторов возрастных изменений ультраструктуры митохондрий, а митохондриально-направленные антиоксиданты являются эффективным методом борьбы с возраст-зависимыми патологическими изменениями митохондрий.

Впервые проведено исследование возраст-зависимых изменений структуры хондриома ткани миокарда голого землекопа (*H. glaber*). В возрасте 6 месяцев общая структура хондриома кардиомиоцитов у этих животных соответствует норме. При этом, согласно морфометрическим расчетам, в кардиомиоцитах голого землекопа в среднем больше митохондрий, чем у молодых крыс и мышей - $0,64 \pm 0,05$ шт. на 1 мкм² ткани (рис.5). Площадь одного сечения митохондрии, напротив, вдвое меньше - $0,46 \pm 0,031$ мкм². Объемная доля митохондрий также меньше чем у остальных исследованных животных и составляет $29,48 \pm 2,52\%$ (рис. 5).

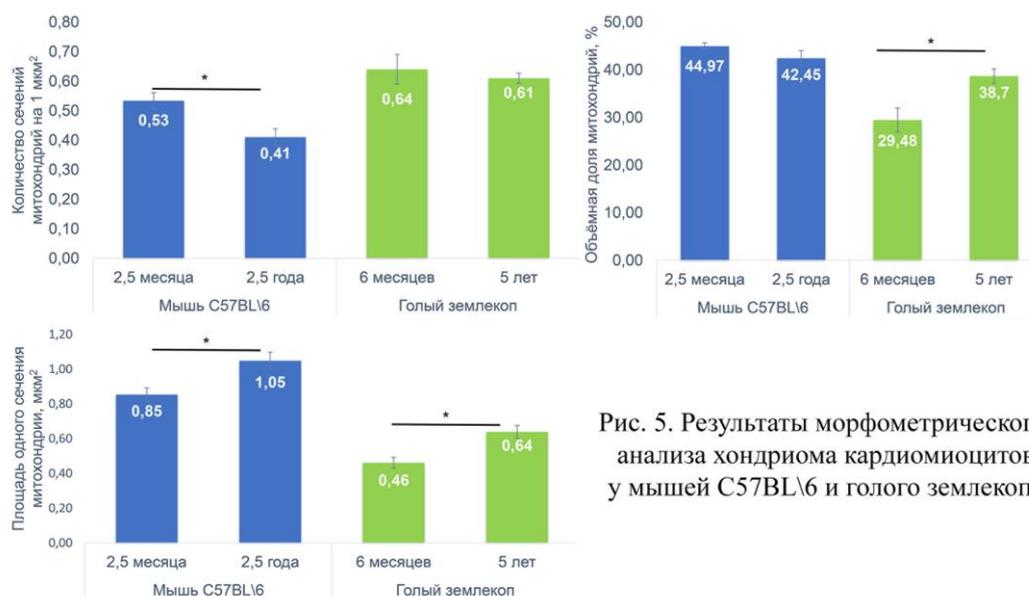


Рис. 5. Результаты морфометрического анализа хондриома кардиомиоцитов у мышей C57BL/6 и голого землекопа

К 60 месяцам ультраструктурных признаков, указывающих на развитие патологических процессов в кардиомиоцитах голого землекопа, нами не выявлено, общая картина хондриома аналогична хондриому 6-ти месячных животных. Количество митохондрий практически не изменяется с возрастом: число сечений митохондрий на 1 мкм² кардиомиоцита голого землекопа в возрасте 60 месяцев составило $0,61 \pm 0,017$ шт. (рис. 5). Площадь одного сечения возрастает до $0,64 \pm 0,037$ мкм², а объемная доля хондриома кардиомиоцита – до $38,7 \pm 1,52$ % (рис. 5). Исходя из наблюдений за изменениями структуры хондриома кардиомиоцитов *H. glaber* с возрастом, мы предполагаем, что в ткани миокарда к пяти годам все еще продолжается становление митохондриального аппарата.

В нашем исследовании хондриома кардиомиоцитов голого землекопа было показано, что митохондрии этих животных имеют особенную, удивительную внутреннюю ультраструктуру, отличающуюся от ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов всех ранее изученных видов млекопитающих: вместо плотных, упакованных во взаимопараллельную структуру крист, характерных для крыс, мышей и других грызунов, у землекопа наблюдается сниженное количество волнистых крист,

образующих завитки, а также большое количество гранул внутри митохондрий (рис. 6).



Рис. 6. Особенности внутренней ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов голого землекопа.



Рис. 7. Площадь поверхности внутренней мембраны на единицу объема митохондрии у мышей C57BL/6 и голого землекопа. *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$

Примечательно, что поверхностная плотность внутренней мембраны митохондрий у голого землекопа в 6 месяцев составляет $31,5 \pm 0,713$ мкм²/мкм³ (рис. 7) и 5 годам этот параметр снижается всего на треть - до $20,9 \pm 0,511$ мкм²/мкм³, в то время как у мышей и крыс мы наблюдали двукратное падение поверхностной плотности внутренней мембраны митохондрий за 2 года (рис. 7). Обнаруженная нами необычная ультраструктурная организация митохондрий кардиомиоцитов голого землекопа, очевидно, отражает функциональные особенности этих органелл. М.Ю. Высоких был показан необычный низкий уровень адениновых нуклеотидов, которые в сердечной мышце даже взрослых *H. glaber* остаются ниже, чем у взрослых мышей. М.Ю. Высоких также наблюдал в митохондриях кардиомиоцитов взрослых *H. glaber* повышенную скорость дыхания после истощения АДФ, что является характерной чертой для митохондрий кардиомиоцитов эмбрионов грызунов. Такое “мягкое разобщение” рассматривается как способ снизить производство АФК. В.П. Скулачёв, сравнивая мышей и голых землекопов, высказал предположение: “если гипотеза, что АФК является токсичным агентом, ведущим к старению, верна, то окислительный стресс должен увеличиваться с возрастом в пострадавших от старения организмах и должен оставаться неизменным в организмах, где последствия старения являются незначительными”.

При исследовании кардиомиоцитов крыс и голого землекопа, примерно в 1-2-х случаях из 50 мы наблюдали локальное отсутствие ядерной оболочки, с расположением митохондрий непосредственно внутри ядра. Такие «открытые» ядра

были обнаружены нами в кардиомиоцитах как старых крыс Wistar и OXYS, так и молодых – 3-х месячных контрольных крыс Wistar, а также у голого землекопа в возрасте 6 месяцев.

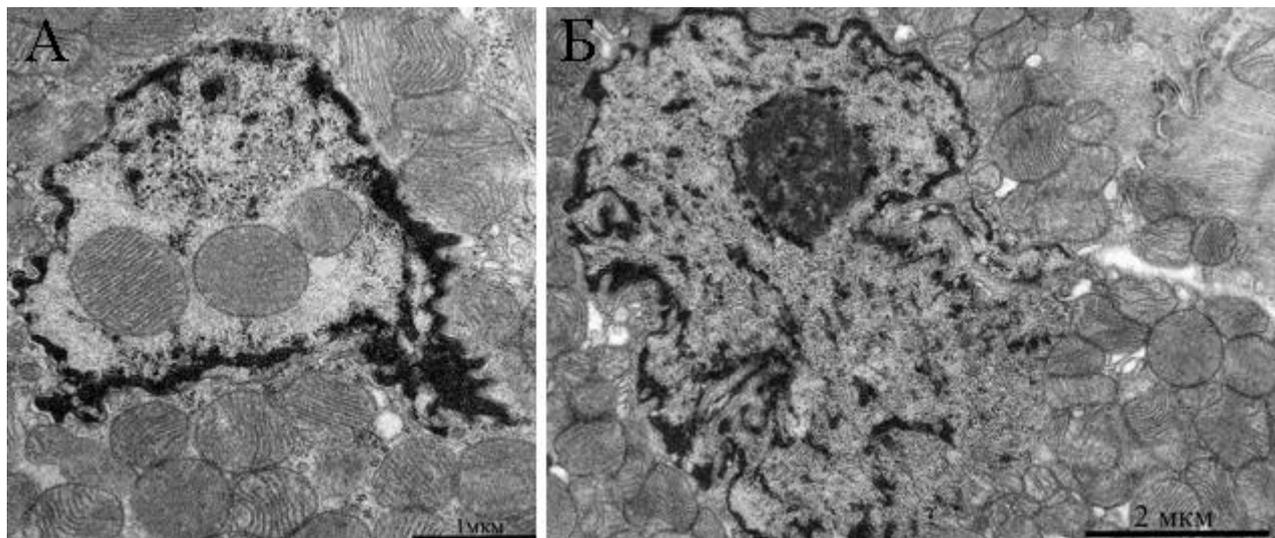


Рис. 8. А: Расположение митохондрий внутри ядра в кардиомиоците крысы Wistar в возрасте 3 месяцев; Б – локальная утрата ядерной оболочки и непосредственное контактирование митохондрий с содержимым ядра в кардиомиоците крысы OXYS в возрасте 24 месяцев.

Нам удалось показать на серийных ультратонких срезах одного и того же ядра, что в зависимости от уровня среза можно получить либо картину расположения митохондрий внутри замкнутого ядра (рис. 8А), либо картину ядра, частично лишённого ядерной оболочки, в результате чего обнаруживается непосредственное контактирование околоядерных митохондрий с содержимым ядра. Такая картина наблюдалась у крыс Wistar, OXYS (рис. 8Б) и голого землекопа.

Эти данные позволяют нам предположить, что в отдельных ядрах кардиомиоцитов, независимо от вида и возраста исследованных нами животных, происходит разбор локальных участков ядерной оболочки с последующим контактированием и продвижением в нуклеоплазму митохондрий, окружающих ядро.

Долгое время существовало представление о том, что разбор ядерной оболочки происходит только при митозе. Предполагалось, что при переходе в постмитотическую фазу клеточного цикла в процессе формирования ядерной оболочки возможен захват митохондрий ядром. В настоящее время в литературе описаны процессы ремоделирования ядерной оболочки и в интерфазных ядрах. Так, регулярный разбор локальных участков ядерной оболочки показан для различных опухолевых клеток, а также кардиомиоцитов больных с патологиями сердца. Мы предполагаем, что взаимодействие митохондрий со структурами ядра не является случайным следствием патологических процессов, а происходит постоянно, являясь отражением сложных митохондриально-ядерных взаимодействий. Последние литературные данные подтверждают это предположение. Так, Жао (Zhao) с коллегами обнаружили, что терминальные стадии эритропоэза у мышей сопровождаются циклическим открыванием и закрыванием ядерной оболочки. Авторы доказали, что для этого процесса необходима каспаза-3. Ингибирование каспазы-3 или мутантный ламин-Б, устойчивый к расщеплению каспазой, приводят не только к остановке процессов

“открывания” ядер, но и к блокировке дальнейшей дифференциации клеток и развитию тяжелых гематологических заболеваний. Таким образом, появление “открытых” ядер и внутриядерных митохондрий у молодых крыс без патологий может свидетельствовать о том, что разбор ламины с “открыванием” ядер и проникновение митохондрий внутрь ядра происходят не только при различных патологиях, но и в процессе развития и нормального функционирования клетки.

Возраст-зависимые изменения ультраструктуры митохондрий скелетной мышцы. Если в ткани миокарда наибольшие изменения с возрастом претерпевает внутренняя ультраструктура митохондрий, то в ткани скелетной мышцы, как на моделях нормального физиологического старения, так и у крыс с ускоренным старением, с возрастом происходят значительные изменения общей структуры хондриома.

На поперечных сечениях мышечных волокон крыс Wistar видно, что к 24 месяцам происходит деградация единой системы митохондриального ретикулума, расположенного в изотропной зоне по обе стороны от Z-диска, что указывает на развитие гипоплазии и атрофии скелетных мышц (рис. 9Б). В поперечно-исчерченных волокнах скелетной мышцы наблюдается радикальное снижение объемной доли митохондрий. У крыс Wistar объемная доля митохондрий снизилась с $37,66 \pm 2,12\%$ до $24 \pm 1,45\%$ (рис. 10).

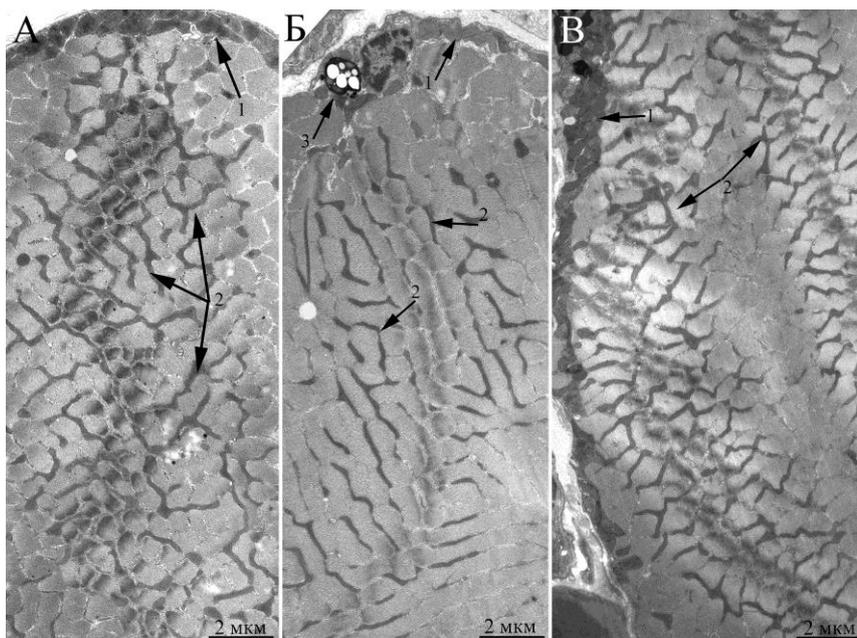


Рис. 9. Ультраструктура скелетной мышцы крысы Wistar: А – в возрасте 3 месяцев; Б - в возрасте 24 месяцев; В - в возрасте 24 месяцев, получавшей препарат SkQ1 в течение 5 месяцев в концентрации 250 нмоль\кг ежедневно. Стрелки: 1 – субсарколеммальная митохондрия; 2 - межфибриллярная митохондрия; 3 – аутофагосома.

У крыс OXYS возрастные патологические изменения структуры хондриома более выражены. Строение хондриома скелетной мышцы крыс OXYS в возрасте 3 месяцев имеет ряд существенных отличий от структуры хондриома скелетной мышцы 3-х месячных крыс Wistar. В изотропной области расположена сеть нитчатых, извитых митохондрий, однако ответвления в анизотропную часть практически отсутствуют. В зоне ядра появляются митохондрии, размеры которых значительно превышают обычные размеры митохондрии. В литературе такие митохондрии определяются как

особый тип митохондрии – мегамитохондрии – возникающие при различных заболеваниях или изменениях физиологического состояния организма (рис. 11А). Объемная доля митохондрий у крыс OXYs уже в 3 месяца снижена более чем вдвое по сравнению с крысами Wistar того же возраста и составляет $17,08 \pm 1,17\%$. С возрастом происходит дальнейшее снижение этого параметра до $5,86 \pm 0,5\%$ (рис. 10), что отражает прогрессирующую дегенерацию хондриома (рис. 11Б) и мышечного волокна в целом, вплоть до разбора миофибрилл в отдельных участках ткани. Также было отмечено появление большого количества аутофагосом.

Рис. 10. Объемная доля митохондрий в мышечных волокнах скелетной мышцы крыс Wistar и OXYs в возрасте 3 и 24 месяцев, получавших и не получавших антиоксидант SkQ1.

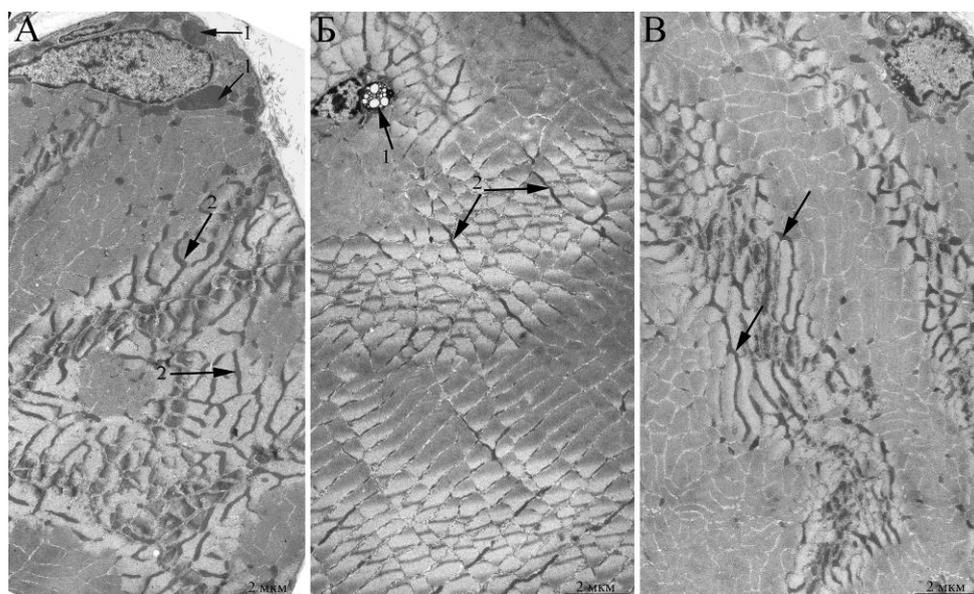
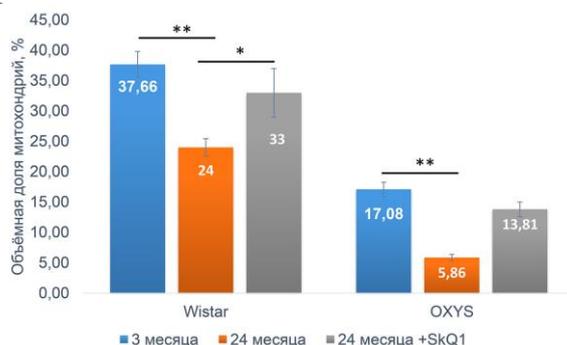


Рис. 11. Ультраструктура скелетной мышцы крысы OXYs: А – в возрасте 3 месяцев; Б - в возрасте 24 месяцев; В - в возрасте 24 месяцев, получавшей препарат SkQ1 в течение 5 месяцев в концентрации 250 нмоль\кг ежедневно. Стрелки: А - 1 – мегамитохондрия, 2 – межфибриллярные митохондрии; Б - 1 – аутофагосома, 2 – межфибриллярные митохондрии; В - межфибриллярные митохондрии.

Применение митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1, как и в кардиомиоцитах, в значительной степени предотвращает дегенеративные возраст-зависимые изменения хондриома мышечных волокон скелетной мышцы и у крыс Wistar, и у крыс OXYs. Мышечная ткань животных в возрасте 24 месяцев, получавших SkQ1 в концентрации 250 нмоль\кг ежедневно в течение 5 месяцев, характеризуется хорошо развитой системой митохондриального ретикулума (рис. 9В и рис. 11В, соответственно), внутренняя ультраструктура митохондрий приближена к таковой у 3-месячных животных. Морфометрический анализ подтвердил выраженный защитный эффект SkQ1: объемная доля митохондрий в изотропной зоне мышечного волокна у

крыс Wistar и OXYS в возрасте 24 месяцев, получавших препарат, составила, соответственно, $33 \pm 4\%$ и $13,81 \pm 1,2\%$ (рис. 10). Принимая во внимание роль окислительного стресса в развитии саркопении, более сильный эффект SkQ1 у крыс OXYS является закономерным.

Для анализа возраст-зависимых изменений структуры хондриома мышечных волокон скелетной мышцы голого землекопа, ввиду отсутствия литературных данных о структуре хондриома скелетной мышцы у этого животного, нами был применен другой подход – исследовались не поперечные срезы, проходящие через изотропную зону вблизи Z-диска, а продольные сечения скелетной мышцы. Морфометрический анализ проводился аналогично анализу структуры хондриома кардиомиоцитов. В качестве контроля были исследованы мышцы C57B\6, поскольку мышцы во многом сходны с голым землекопом: оба животных являются мелкими грызунами почти одного и того же размера и имеют достаточно близкое строение.

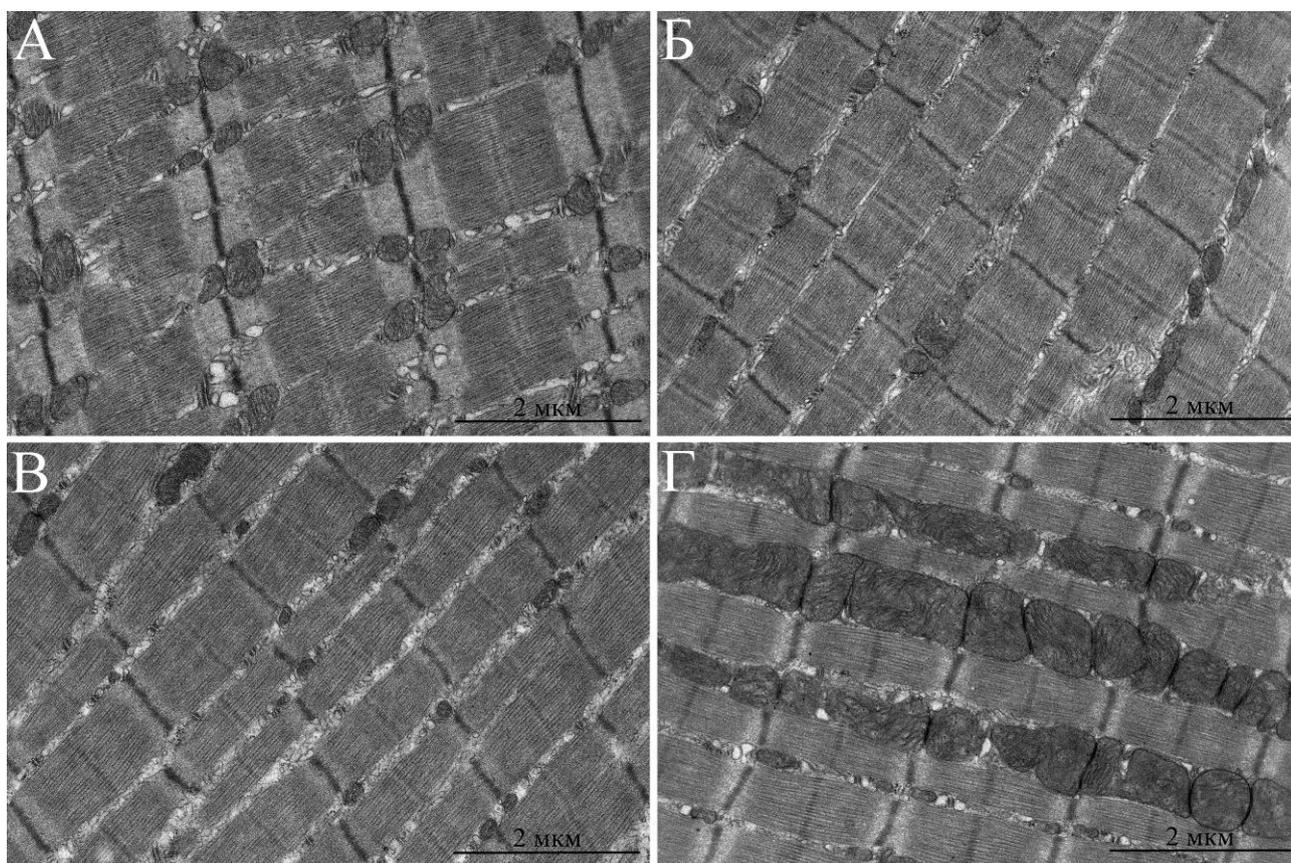


Рис. 12. Фотография продольного среза мышечного волокна скелетной мышцы: А – мышцы C57BL\6 в возрасте 2,5 месяцев; Б – мышцы C57BL\6 в возрасте 2,5 лет; В - голого землекопа в возрасте 6 месяцев; Г - голого землекопа в возрасте 5 лет.

В возрасте 2,5 месяцев хондриом скелетной мышцы мыши C57B\6 соответствует классическим представлениям: разветвленные митохондрии образуют единую систему митохондриального ретикулума, который на продольном сечении ткани выглядит как небольшие сферические или эллиптические парные органеллы, расположенные в районе изотропной зоны по обе стороны Z-дисков (рис. 12А). С возрастом происходит прогрессирующее снижение общего количества митохондрий, структура ретикулума нарушается. В возрасте 30 месяцев хондриом мышечного волокна скелетной мышцы мышцей C57B\6 представлен одиночными митохондриями (рис. 12Б). Данные

визуальных наблюдений подтверждаются результатами морфометрического анализа: количество сечений митохондрий на 1 мкм^2 мышечного волокна скелетной мышцы у этих животных снижается с $0,47 \pm 0,061$ шт. в возрасте 3 месяцев, до $0,23 \pm 0,017$ шт./ мкм^2 в возрасте 30 месяцев, при одновременном увеличении средней площади одного сечения с $0,16 \pm 0,015$ до $0,23 \pm 0,009$ мкм^2 (рис.13). Объёмная доля митохондрий снижается на треть – с $7,70 \pm 1,5\%$ до $5,45 \pm 0,6\%$ (рис. 13).

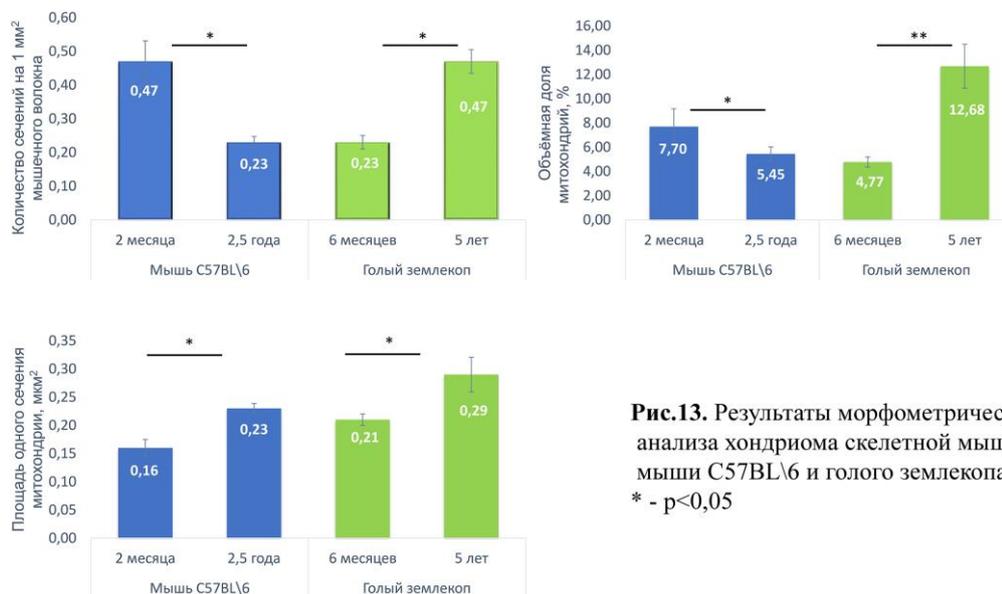


Рис.13. Результаты морфометрического анализа хондриома скелетной мышцы мыши C57BL/6 и голого землекопа.
* - $p < 0,05$

В скелетной мышце голого землекопа (*H. glaber*) мы наблюдали принципиально иную, уникальную картину, отличную от скелетной мышцы других описанных в литературе млекопитающих. Общая структура хондриома нетипична для скелетной мышцы – если в 6 месяцев он представлен единичными митохондриями (рис. 12В), то к 5 годам в волокнах мышечной ткани происходит резкое увеличение количества и размеров митохондрий, которые формируют большое число крупных межфибриллярных митохондриальных кластеров, поразительно схожих со структурой хондриома кардиомиоцитов (рис. 12Г). Количество сечений митохондрий на 1 мкм^2 мышечного волокна возрастает с $0,23 \pm 0,02$ шт./ мкм^2 в возрасте 6 месяцев, до $0,47 \pm 0,03$ шт./ мкм^2 , средняя площадь одного сечения митохондрии также растёт – с $0,21 \pm 0,01$ до $0,29 \pm 0,03$ мкм^2 (рис. 13). В результате, у голого землекопа с возрастом практически утраивается объёмная доля митохондрий в скелетной мышце – с $4,77 \pm 0,42\%$ до $12,68 \pm 1,81\%$ (рис. 13). Подобный результат полностью расходится с имеющимися представлениями по изменению ультраструктуры митохондриального аппарата скелетной мышцы с возрастом.

Следует особо отметить тот факт, что и в возрасте 6 месяцев, и в возрасте 60 месяцев в скелетной мышце голого землекопа формирования митохондриального ретикулума так и не происходит. На поперечном сечении скелетной мышцы *H. glaber* в возрасте 60 месяцев видна Z-линия, окруженная изотропной областью, в которой, вместо длинных разветвленных митохондрий располагаются отдельные органеллы овальной или округлой формы (стрелки на рис. 14), не образующие единой сети. Подобная картина характерна для новорожденных крыс, однако к 3 месяцам формирование митохондриального ретикулума у крыс полностью завершается. Мы предполагаем, что в скелетной мышце голого землекопа в возрасте 60 месяцев митохондриальный ретикулум все еще находится в процессе формирования. В свете

этих данных, атипичную модель развития ультраструктуры хондриома поперечно-исчерченных мышц у голого землекопа можно рассматривать как длительную задержку развития, что, в свою очередь, может являться еще одним подтверждением гипотезы о наличии у *Heterocephalus glaber* неотении — сохранения эмбриональных черт во взрослом, половозрелом возрасте.

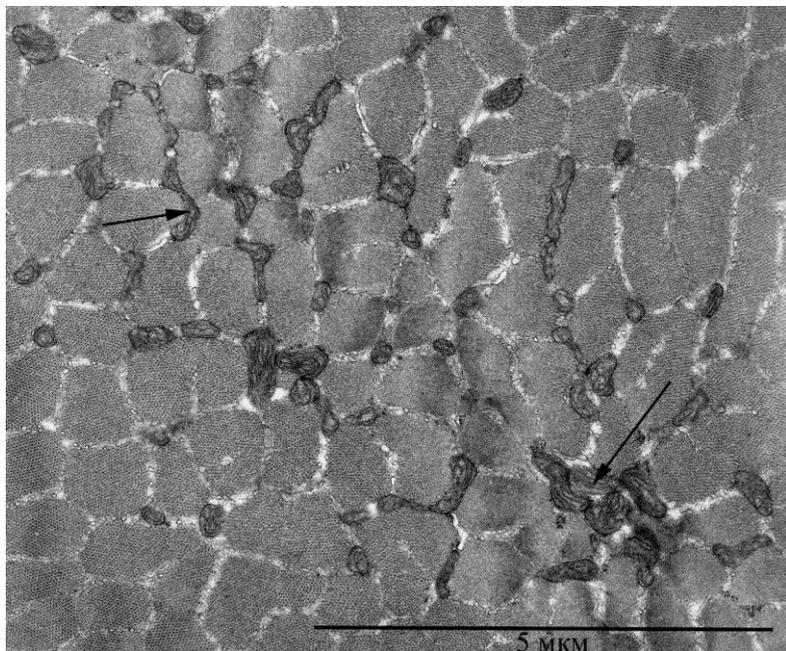


Рис. 14. Поперечный срез скелетной мышцы голого землекопа в возрасте 60 месяцев. Стрелками показаны митохондрии.

Возраст-зависимые изменения ультраструктуры слезной железы. Нами был проведен анализ возраст-зависимых изменений ультраструктуры ацинарных клеток, а также эпителиальных клеток протоков слезной железы крыс Wistar и OXYS. Было показано, что структура слезной железы с возрастом значительно меняется. Происходит практически полная дегградация ацинусов как у крыс Wistar, так и у крыс OXYS. Морфометрические подсчеты показали, что число ацинусов на единицу площади ткани у крыс Wistar снижается с $97 \pm 6,09$ шт. в возрасте 3 месяцев до $3,73 \pm 0,63$ шт. в возрасте 24 месяцев (рис. 15). У крыс OXYS уже в 3 месяца число ацинусов значительно снижено по сравнению с контрольными животным - $53,82 \pm 1,98$ шт., а к 24 месяцам в ткани слезной железы крыс OXYS можно видеть лишь единичные ацинусы - $2 \pm 0,63$ шт. (рис. 15).

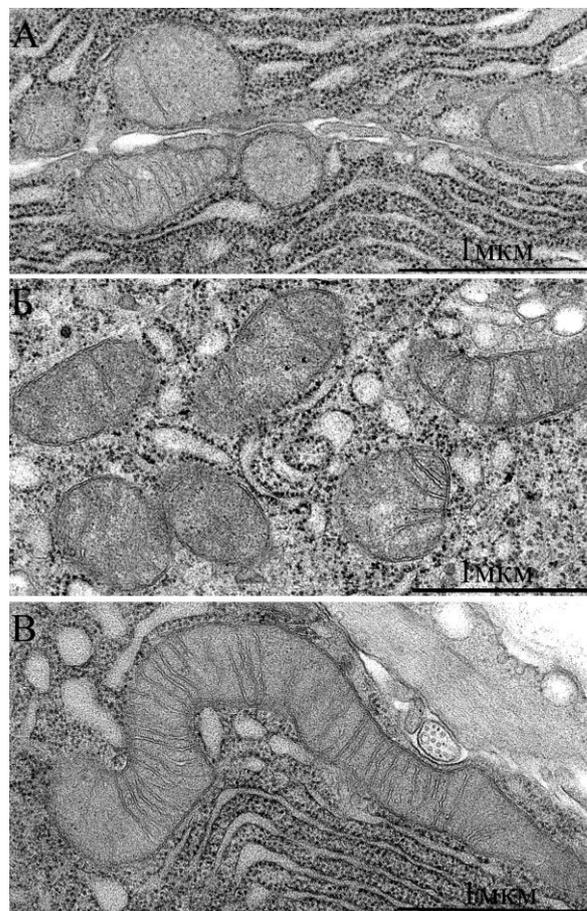


Рис. 15. Количество ацинусов на единицу площади в $0,23 \text{ мм}^2$ у крыс Wistar в возрасте 3 и 24 месяцев, получавших и не получавших SkQ1, а также крыс OXYS в возрасте 3 и 24 месяцев.

Несмотря на прогрессирующую дегградацию с возрастом общей структуры ацинарных клеток, внутренняя ультраструктура митохондрий в сохранившихся

ацинарных клетках меняется незначительно (рис. 16). К 24 месяцам большую часть ткани слезной железы у крыс Wistar и OXYS занимают интеркалярные протоки. Помимо увеличения количества протоков наблюдается также их ветвление. Эпителиальные клетки большинства протоков изменяют свою структуру на электронно-плотную, с большим количеством электронно-плотных гранул, которые заполняют и просвет протока, вызывая его закупорку.

Рис. 16. Ультраструктура митохондрий ацинарных клеток в слезной железе крысы Wistar. А: в 3 месяца; Б: в 24 месяца; В – в возрасте 24 месяцев, получавшей SkQ1 в концентрации 250 нмоль\кг ежедневно с 1,5 месяцев.



На модели нормального физиологического старения (у крыс Wistar) применение антиоксиданта SkQ1 значительно снижает степень возрастных патологических изменений. В ткани 24-месячных животных, получавших препарат в концентрации 250 нмоль\кг ежедневно с 1,5 месяцев, присутствует большое количество ацинусов с нормальной ультраструктурой – их число на единицу площади составляет $26,4 \pm 2,44$ шт (рис. 15). Ультраструктура интеркалярных протоков слезной железы крыс Wistar в возрасте 24 месяцев, получавших SkQ1, соответствует протокам 3-х месячных крыс Wistar, однако существенным отличием от молодых животных является наличие в цитоплазме эпителиальных клеток множества электронно-плотных гранул.

Примечательно, что, хотя с возрастом структура хондриома ацинарных клеток слезной железы менялась слабо, применение SkQ1 привело к появлению в клетках крупных разветвленных митохондрий (рис. 16B). Средняя площадь сечения одной митохондрии у животных в возрасте 24 месяцев, получавших SkQ1, составила $0,38 \text{ мкм}^2$ против $0,23 \text{ мкм}^2$ у 24-месячных животных, не получавших SkQ1, и $0,14 \text{ мкм}^2$ у 3-х месячных животных. У крыс OXYS, характеризующихся повышенной генерацией АФК в тканях, применение SkQ1 с 1,5 месяцев не оказывает заметного эффекта.

Возможно, в случае крыс OXYS для достижения эффекта антиоксидантов, требуется их применение с неонатального периода, учитывая раннее стремительное развитие необратимых дегенеративных изменений в тканях этих животных.

ВЫВОДЫ

1. При нормальном физиологическом старении, у крыс Wistar, мышей C57BL/6, в ткани миокарда происходит снижение количества митохондрий и увеличение их размеров;
2. Ускоренное старение в условиях повышенной генерации АФК у крыс OXYS приводит к обратному эффекту: в кардиомиоцитах увеличивается количество митохондрий и снижаются их размеры.
3. В кардиомиоцитах крыс Wistar и OXYS, а также мышей C57BL/6 показано снижение с возрастом поверхностной плотности внутренней мембраны митохондрий, которое более выражено у крыс OXYS.
4. Выявлено отсутствие ядерной оболочки в локальных участках ядра в кардиомиоцитах крыс Wistar и OXYS и голого землекопа (*H. glaber*).
5. Выявлены закономерности развития возраст-зависимых изменений ультраструктуры хондриома скелетной мышцы:
 - нарушение структуры митохондриального ретикулума, снижение объемной доли митохондрий у крыс Wistar и OXYS, а также мышей C57BL/6;
 - в условиях повышенной генерации АФК у крыс OXYS, изменения более выражены и развиваются в более раннем возрасте.
6. У голого землекопа (*H. glaber*) к 60 месяцам отсутствуют возраст-зависимые изменения структуры хондриома кардиомиоцитов.
7. В скелетной мышце *H. glaber* единая система митохондриального ретикулума отсутствует как в возрасте 6 месяцев, так и в возрасте 60 месяцев.
8. Хондриом скелетной мышцы *H. glaber* в возрасте 60 месяцев организован по типу хондриома кардиомиоцитов.
9. Выявлена практически полная деградация ацинарных клеток и сильное разрастание протоков слезной железы в условиях нормального и ускоренного старения, у крыс Wistar и OXYS, соответственно. Ультраструктура митохондрий ацинарных клеток с возрастом меняется незначительно.
10. Применение митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 значительно снижает степень возраст-зависимых изменений в ультраструктуре ткани миокарда и скелетной мышцы крыс Wistar и OXYS, а также слезной железы крыс Wistar.

Перечень публикаций по теме диссертации

- [1] Обнаружение митохондрий в ядре как следствие открывания ядер / Л. Е. Бакеева, И. М. Вангели, **Ч. М. Эльдаров**, В. Б. Вайс. // Материалы международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация", Пушкино, Россия, 22-25 мая 2017, С. 587-588.
- [2] Ультраструктура хондриома скелетной мышцы голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) / Л. Е. Бакеева, В. Б. Вайс, **Ч. М. Эльдаров**, И. М. Вангели. // Материалы международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация", Пушкино, Россия, 22-25 мая 2017, С 593-596
- [3] Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 reduces age-related alterations in the ultrastructure of the lacrimal gland / L. E. Bakeeva, **C. M. Eldarov**, I. M. Vangely et al. // *Oncotarget*. — 2016. — Vol. 7, no. 49. — P. 80208–80222.
- [4] Изучение возрастных особенностей структурно-функциональных изменений митохондрий скелетных мышц и сердца голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) / С. Хольтце, **Ч. М. Эльдаров**, В. Б. Вайс, И. М. Вангели и др. // *Биохимия* — 2016. — Т81, № 12. — С. 1703-1712.
- [5] Взаимодействие митохондрий с компонентами ядра. Ультраструктурная картина / **Ч. М. Эльдаров**, И. М. Вангели, В. Б. Вайс, Л. Е. Бакеева. // Тезисы XXVI Российской конференции по электронной микроскопии в рамках Конференции 4-й Школы молодых учёных «Современные методы электронной и зондовой микроскопии в исследованиях наноструктур и наноматериалов, г. Москва, Зеленоград, Россия, 30 мая - 3 июня 2016.
- [6] Морфометрическое исследование ультраструктуры митохондрий при старении / **Ч. М. Эльдаров** // Материалы международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация", Пушкино, Россия, 25-28 мая 2015.
- [7] Морфометрическое исследование ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов при старении / **Ч. М. Эльдаров**, В. Б. Вайс, И. М. Вангели и др. // *Биохимия* — 2015. — Т. 80, №5. — С. 716–722.
- [8] Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia-associated damage of mitochondrial ultrastructure / V. B. Vays, **C. M. Eldarov**, I. M. Vangely et al. // *AGING-US*. — 2014. — Vol. 6, no. 2. — P. 140–148.
- [9] Действие митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на развитие возраст-зависимых изменений мышечной ткани. / **Ч. М. Эльдаров** // XIX международная молодежная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов", Россия, Москва, МГУ, Лабораторный корпус Б, 2012
- [10] Действие митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на ультраструктуру скелетной мышцы при развитии саркопении. / В. Б. Сапрунова, Л. Е. Бакеева, **Ч. М. Эльдаров**. // Международная конференция "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация", Пушкино, Россия, Россия, 2011, С. 753 - 757

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода;

SkQ1 - 10-(6'-Пластохинонил) децилтрифенилфосфоний.