

Новые доказательства адаптационной роли митохондриальных изменений при врожденной миопатии центрального стержня

И.С. Виноградская, В.С. Сухоруков, Д.А. Харламов, Т.И. Баранич, П.А. Шаталов, А.В. Брыдун, Т.Г. Кузнецова, В.В. Глинкина

Российский национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова, Научно-исследовательский клинический институт педиатрии, Москва

Adaptational role of mitochondrial changes in congenital central core myopathy: new proofs

I.S. Vinogradskaya, V.S. Sukhorukov, D.A. Kharlamov, T.I. Baranich, P.A. Shatalov, A.V. Brydun, T.G. Kuznetsova, V.V. Glinkina

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; Research Clinical Institute of Pediatrics, Moscow

Целью работы явилось морфометрическое изучение ультраструктурных параметров митохондрий мышечной ткани в сопоставлении с другими клиничко-лабораторными показателями при врожденной миопатии центрального стержня (21 пациент). Полученные результаты демонстрируют, что размеры митохондрий объединены корреляционными связями с показателями лактата и пирувата, однако величина и направление этой связи различаются в субсарколеммальной и межмиофибриллярной фракции. Сделан вывод о том, что базовый уровень молочной кислоты в крови пациентов зависит от количества митохондрий; тогда как степень зрелости органелл в большей степени обеспечивает реакцию ткани в ответ на повышение уровня молочной кислоты. Наши данные подтверждают предположение о том, что округлые митохондрии являются менее зрелыми и эффективными в отношении выполнения своих основных функций. Определено, что увеличение количества эллипсоидных органелл в субсарколеммальном регионе мышечного волокна является важным компенсаторным механизмом при заболеваниях мышц «немитохондриального» генеза. Таким образом, установлена роль изменения числа и размеров митохондрий в обеспечении тканевой адаптации к условиям функциональной недостаточности. Выявленные морфометрические параметры митохондрий могут быть использованы в качестве диагностических маркеров при оценке характера течения нервно-мышечных заболеваний.

Ключевые слова: дети, миопатия, болезнь центрального стержня, митохондрия, адаптация, субсарколеммальная фракция, межмиофибриллярная фракция.

The objective of the investigation was to study the ultrastructural morphology of muscle tissue mitochondria versus other clinical and laboratory indicators in 21 patients with congenital central core myopathy. The findings demonstrate that the sizes of mitochondria are correlated with the levels of lactate and pyruvate; however, the magnitude and direction of this correlation differ in the subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial fractions. It is concluded that the baseline level of lactic acid in the blood of the patients depends on the number of mitochondria whereas the maturity of organelles largely provides a tissue response to elevated lactic acid levels. Our data are evidence in favor of an assumption that rounded mitochondria are less mature and effective in performing their main functions. The increase in the number of ellipsoidal organelles in the subsarcolemmal region of muscle fibers is ascertained to be an important compensatory mechanism in nonmitochondrial muscle diseases. Thus, the investigation has established the role of changes in the number and sizes of mitochondria in tissue adaptation to the conditions of functional insufficiency. The found mitochondrial morphometric parameters may be used as diagnostic markers to evaluate the pattern of neuromuscular diseases.

Key words: children; myopathy, central core myopathy, mitochondrion, adaptation, subsarcolemmal fraction, intermyofibrillar fraction.

© Коллектив авторов, 2014

Ros Vestn Perinatol Pediat 2014; 2:80–82

Адрес для корреспонденции: Виноградская Ирина Сергеевна — зав. учебной лабораторией кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Российского национального исследовательского университета им. Н.И. Пирогова

Баранич Татьяна Ивановна — асп. той же кафедры

Кузнецова Татьяна Георгиевна — к.б.н., доц. той же кафедры

Глинкина Валерия Владимировна — д.м.н., проф., зав. той же кафедрой 117997 Москва, ул. Островитянова, д. 1

Сухоруков Владимир Сергеевич — д.м.н., проф., зав. научно-исследовательской лабораторией общей патологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии

Шаталов Петр Алексеевич — к.б.н., н.с. той же лаборатории

Брыдун Анатолий Васильевич — к.м.н., ст.н.с. той же лаборатории

Харламов Дмитрий Алексеевич — к.м.н., в.н.с. отделения психоневрологии и эпилептологии того же учреждения

125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

Врожденные миопатии являются группой редких, клинически и генетически гетерогенных заболеваний. Одно из них — миопатия центрального стержня, наследуемая по доминантному типу и аллельная по отношению к злокачественной гипертермии, впервые была описана G. Shy и K. Magee в 1956 г. Заболевание вызывается мутацией в гене рианодинового рецептора *RYR1*, локализованного на хромосоме 19 (q13.1). Диагноз врожденной миопатии центрального стержня ставится на основании результатов мышечной биопсии в сочетании с характерными клиническими чертами [1].

Митохондриальная дисфункция при врожденных структурных миопатиях была описана еще в начале

изучения заболеваний этой группы [2]. При морфологическом исследовании мышечных биоптатов пациентов с врожденными структурными миопатиями, врожденными и прогрессирующими мышечными дистрофиями довольно часто выявляются признаки митохондриальных нарушений, проявляющиеся увеличением количества митохондрий в миоонах и изменением их активности [3]. С одной стороны, увеличение количества митохондрий грозит клетке дискоординацией окислительных процессов; с другой — при этом может повышаться энергетический потенциал мышечной ткани [4, 5].

Изучение митохондриальной пролиферации при адаптационных процессах особенно актуально на современном этапе развития клинической миологии, когда еще отсутствуют специфические генетические методы лечения подавляющего большинства наследственных нервно-мышечных заболеваний. Анализ этих процессов может помочь в разработке неспецифических терапевтических подходов при лечении различных заболеваний мышц. На основании ряда специально проведенных исследований можно предположить, что митохондриальная пролиферация может определяться репарационным потенциалом указанных органелл и играть важную роль в адаптационных процессах [6]. Большую помощь в определении значения этой пролиферации может сыграть сравнение данных морфометрического анализа митохондрий с клиническими и лабораторными показателями больных.

Исходя из этого, целью настоящей работы явилось морфометрическое изучение ультраструктурных параметров митохондрий мышечной ткани в сопоставлении с другими клинико-лабораторными показателями при врожденной миопатии центрального стержня.

ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведена комплексная морфометрическая оценка электронно-микроскопических изображений поперечно-полосатых мышечных волокон 21 больного в возрасте от 4 до 42 лет с врожденной миопатией центрального стержня.

Электронно-микроскопическое исследование материала проведено по традиционной методике на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL JEM-100В. Морфометрический анализ осуществлялся путем подсчета митохондрий, разделенных на две популяции в зависимости от места расположения в мышечном волокне: под сарколеммой (субсарколеммальный участок) и между миофибриллами (межмиофибриллярный участок), с помощью компьютерной программы для микрофотометрии Image J при увеличении $\times 10\,000$.

Для определения уровня молочной и пировиноградной кислот был проведен биохимический анализ с помощью энзиматического метода (Rollinghoff, 1967).

Полученные результаты обработаны при помощи пакета программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel 2007. Для выявления взаимосвязей изучаемых признаков был проведен ранговый корреляционный анализ по Спирмену.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе работы с помощью рангового корреляционного анализа были получены следующие результаты:

1. Определена достоверная положительная корреляция между количеством субсарколеммальных митохондрий и коэффициентом «лактат/пируват» до нагрузки глюкозой и через 3 ч после нагрузки ($R=0,64$; $R=0,94$ соответственно; $p<0,05$).

2. Выявлена сильная положительная корреляция между отношением числа митохондрий в субсарколеммальной области к числу митохондрий в центральной зоне и показателем лактата в крови до нагрузки глюкозой ($R=0,70$; $p<0,05$). Однако через 1 ч после нагрузки между этими показателями была выявлена отрицательная корреляция ($R= - 0,66$; $p<0,05$), а спустя 3 ч — слабая положительная корреляция ($R=0,46$; $p<0,05$).

3. В субсарколеммальной фракции размеры (площадь и периметр) митохондрий отрицательно коррелировали со степенью тяжести заболевания ($R= - 0,72$; $R= - 0,86$ соответственно; $p<0,05$).

4. Число митохондрий эллипсоидной формы в субсарколеммальном регионе отрицательно коррелировало со степенью тяжести заболевания ($R= - 0,86$; $p<0,05$).

5. В субсарколеммальной фракции митохондрий количество митохондрий с эллипсоидной формой положительно достоверно коррелировало с уровнем лактата в периферической крови больных до нагрузки глюкозой ($R=0,90$; $p<0,05$). Однако уже спустя 1 ч после нагрузки была выявлена тенденция к отрицательной корреляции ($R= - 0,36$; $p<0,01$), а спустя 3 ч вновь отмечена положительная корреляция ($R=0,56$; $p<0,05$). Количество митохондрий округлой формы достоверно отрицательно коррелировало с уровнем пирувата в крови ($R= - 0,90$; $p<0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты демонстрируют, что размеры митохондрий достоверно объединены корреляционными связями с показателями лактата и пирувата, однако величина и направление этой связи различаются в субсарколеммальной и межмиофибриллярной фракциях. Все это указывает на принци-

пиальные функциональные различия митохондрий в двух рассматриваемых фракциях.

Базовый уровень концентрации молочной кислоты обнаруживает сильную положительную зависимость от удельного количества митохондрий в субсарколеммальном регионе в отличие от центральных зон мышечного волокна. При этом такой зависимости концентрации лактата через 1 ч после нагрузки глюкозой не выявляется, установлена отрицательная корреляция между этими переменными, а уже через 3 ч после нагрузки снова выявляется слабая тенденция к положительной корреляции. Мы объясняем это тем, что увеличенное количество митохондрий в данных участках имеет компенсаторное значение и носит вторичный по отношению к тканевому энергодефициту (сопровождающемуся повышением уровня лактата) характер.

Большой интерес, по нашему мнению, представляют выявленные у больных с миопатией центрального стержня соотношения между формой митохондрий в их субсарколеммальной фракции и концентрацией молочной кислоты в крови. Данные соотношения (положительная корреляция «эллипсоидности» митохондрий с уровнем лактата до и через 3 ч после нагрузки, отрицательная — с уровнем лактата через 1 ч после нагрузки) можно объяснить тем, что базовый уровень молочной кислоты в крови пациентов с болезнью центрального стержня в основном зависит от количества митохондрий (что подтверждается соответствующими коэффициентами корреляции), тогда как степень зрелости органелл в большей мере обеспечивает реакцию ткани в ответ на повышение уровня молочной кислоты. Таким образом, степень зрелости митохондрий, выражающаяся в их относительно эллипсоидной форме связана с адаптационным потенциалом тканевых биоэнергетических реакций.

Косвенным образом это предположение подтверждается выявленной нами отрицательной корреляцией между степенью округлости митохондрий и базовой концентрацией пировиноградной кислоты. Возможно, округлые митохондрии являются относительно «молодыми» органеллами, образовавшимися сразу после почкования митохондрий. Следовательно, наши данные подтверждают предположение о том, что округлые митохондрии являются менее зрелыми и эффективными в отношении выполнения своих основных функций [7, 8]. При этом эллипсоидная форма митохондрий имеет сильную отрицательную корреляцию со степенью тяжести заболевания. Полученные результаты подтверждают нашу мысль о том, что увеличение количества эллипсоидных органелл в субсарколеммальном регионе мышечного волокна является важным компенсаторным механизмом при заболеваниях мышц «немитохондриального» генеза.

Выявленная сильная отрицательная корреляция между удельным количеством митохондрий в субсарколеммальной фракции и степенью тяжести заболевания свидетельствует, что повышение количества митохондрий имеет очевидный компенсаторный эффект и напрямую связано с более легким течением болезни. Приведенные данные ещё раз подтверждает гипотезу о компенсаторном характере пролиферации митохондрий в субсарколеммальном регионе мышечного волокна [9].

Подводя итог, можно заключить, что в результате нашего исследования установлена роль изменения числа и размеров митохондрий в обеспечении тканевой адаптации к условиям функциональной недостаточности. Выявленные морфометрические параметры митохондрий могут быть использованы в качестве диагностических маркеров в неврологической практике при оценке характера течения нервно-мышечных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Quinlivan R.M., Muller C.R., Davis M. et al.* Central core disease: clinical, pathological, and genetic features. *Arch Dis Child* 2003; 88: 1051—1055.
2. *Shy G.M., Gonatas N.K., Perez M.* Two childhood myopathies with abnormal mitochondria. I. Megaconial myopathy. II. Pleoconial myopathy. *Brain* 1966; 89: 1: 133—158.
3. *Сухоруков В.С., Харламов Д.А.* Врожденные миопатии. М: ООО Пресс-Арт 2010; 155. (*Sukhorukov V.S., Kharlamov D.A.* Congenital Myopathies. М: ООО Press-Art 2010; 155.)
4. *Sukhorukov V.S.* Quantitative Alterations in Mitochondria: Adaptation Contra Violation In: *Adaptation Biology and Medicine* (Volume 6: Cell Adaptations and Challenges). Eds: P. Wang, C.-H. Kuo, N. Takeda, P.K. Singal. Narosa Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, India, 2011; 77—89.
5. *Wiesner R.J., Hornung T.V., Garman J.D. et al.* *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31: 6: 559—567.
6. *Сухоруков В.С.* Очерки митохондриальной патологии. М: Медпрактика 2011; 288. (*Sukhorukov V.S.* Essays of mitochondrial pathology. М: Medpraktika 2011; 288.)
7. *Picard M., Hepple R.T., Buelle Y.* Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 302: 4: 629—641.
8. *Cury D.P., Dias F.J., Sosthenes M.C. et al.* Morphometric, quantitative, and three-dimensional analysis of the heart muscle fibers of old rats: transmission electron microscopy and high-resolution scanning electron microscopy methods. *Microsc Res Tech* 2013; 76: 2: 184—195.
9. *Sukhorukov V.S.* Energy deficient diathesis as energy metabolism disadaptation in children. *Mat. of VIII World Congress of Int. Soc. for Adaptive Medicine.* Moscow 2006; 1: 19: 54.

Поступила 13.01.14