

Литература

1. Беневоленская Л. И. Остеопороз: клинические рекомендации / Л. И. Беневоленская, Н. В. Торопцова, О. А. Никитинская // Лечащий врач. – 2006. – №10. – С.50–53.
2. Король Д.М. Стан кісткової тканини щелеп за даними гістограмної морфометрії ортопантомограм / Д.М. Король, І.М. Ткаченко, Г.Ю. Алекунов, С.М. Білий // Український стоматологічний альманах. – 2011. – № 6. – С. 6-8.
3. Косенко К. Н. Нарушения кальций-фосфорного обмена и метаболизма костной ткани у лиц молодого возраста и влияние их на развитие и степень тяжести заболеваний пародонта / К. Н. Косенко, Ю. Е. Косоверов, Ю. Г. Чумакова // Вісник стоматології.– 2003. – №4. – С. 20–27.
4. Масна З.З. Закономірності вікової перебудови коміркової частини нижньої щелепи в онтогенезі / З.З. Масна, Х.І. Павлів, С.Ю. Чайковська, Л.О. Дахно, Р.П. Криницький // Матеріали XII з'їзду ВУЛГ. – Київ. – 2013. – С. 302-303.
5. Масна З.З. Використання можливостей радіовізіографії для діагностики стану кісткової тканини / З.З. Масна, Х.І. Гарасим, Р.П. Криницький, Л.О. Дахно // Матеріали наукового конгресу. IV міжнародні Пироговські читання. V з'їзд анатомів, гістологів, ембріологів і топографоанатомів України. – Вінниця. – 2010. – С. 76.
6. Павлів Х.И. Определение плотности минерализованных тканей и ранняя диагностика метаболических нарушений /Х.И. Павлів, С.Ю. Чайковська, Р.П. Криницький // Современные аспекты реабилитации в медицине. Материалы VI международной конференции. – Ереван. – 2013. – С. 343.
7. Чумакова Ю. Г. Показники мінерального обміну і структурно-функціональний стан кісткової тканини в хворих генералізованим пародонтитом різних вікових груп / Ю. Г. Чумакова // Вісник стоматології. – 2006. – №2. – С. 37-42.

МОРФОМЕТРИЯ МИТОХОДРИЙ ПЕЧЕНИ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

*Курбат М. Н., Цыркунов В. М., Кравчук Р. И.

Центральная научно-исследовательская лаборатория
Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь
*Corresponding author: vwmisha@mail.ru

Abstract

MORPHOMETRY OF MITOCHONDRIA OF THE LIVER UNDER TOXIC EFFECTS OF ANTIRETROVIRAL THERAPY

Background: Recently, mitochondrial dysfunction mechanisms play a central role in the development of side effects of antiretroviral drugs, which play a key role in the treatment of HIV infection.

Material and methods: Morphometric parameters of hepatocyte mitochondria were studied in primary and repeated liver biopsy of HIV-infected patient with side effect lipodystrophy, while taking nucleoside reverse transcriptase inhibitors.

Results: Under condition of antiretroviral toxic effect on liver mitochondria an increase in optical density matrix of the mitochondria, which indicates their condensation. According to the literature, these changes are accompanied by functional abnormalities of mitochondria and preceded by induction mediated mitochondrial mechanisms of programmed death of cells which occurs in the final stage of the mitochondrial apoptosis pathway. Intermembrane space expands, due to which the total amount of mitochondria remains the same. The most important functional structure of mitochondria - the inner membrane - at this stage, maintained, despite the fact that the observed expansion of cristae. Condensation and swelling of mitochondria may reflect functional cell voltage, but growing increasingly toxic effects.

Conclusions: Thus, against toxic effects of antiretroviral drugs hepatocytes in liver tissue formed complex structural changes of mitochondria, more objective evidence of the development of degenerative diseases in these organelles in drug therapy for HIV infection.

Key words: liver, mitochondria, electron microscopy, side effect, HIV.

Актуальность

Митохондрии являются важнейшими внутриклеточными структурами, выполняющими значительную роль не только в функционировании клеток млекопитающих в нормальных условиях, но и в различных патологических процессах.

Несмотря на десятки тысяч работ, посвященных исследованию митохондриальных функций, роль митохондрий в жизнедеятельности клетки и их участие в регуляции внутриклеточных процессов все еще остаются не выясненными.

Важнейшей особенностью митохондрий является значительная динамичность их морфологии в ответ на различные изменения клеточного метаболизма. Изменяться могут не только их форма, расположение, размеры и количество, но и внутренняя организация – ультраструктура.

Изучение особенностей ультраструктуры митохондрий в сочетании с современными теоретическими представлениями митохондриологии чрезвычайно перспективны в исследованиях, и не только с точки зрения фундаментальных исследований, но и для разработки, профилактики и, возможно, даже для лечения заболеваний, связанных с митохондриальной дисфункцией [1].

Визуальное описание выявляемых изменений ультраструктуры митохондрий, как, впрочем, и других клеточных компонентов, при различных патологических процессах является недостаточным и малоинформативным: оно не может дать точную, объективную и статистически достоверную оценку степени этих изменений. Такая оценка возможна лишь с использованием специальных методов, – методов морфометрии, – позволяющих объективизировать исследование и получить принципиально новые данные о строении и пространственной организации изучаемых структур.

В последнее время механизмам дисфункции митохондрий отводится центральная роль при развитии побочных эффектов приема антиретровирусных лекарственных средств, играющих ключевую роль в терапии ВИЧ-инфекции.

Главный механизм в патогенезе вызываемых нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы (НИОТ) метаболических нарушений и повреждений различных органов – это токсическое действие на митохондрии. НИОТ представляют собой пролекарства, т.е. неактивную форму препарата. Ингибировать активность фермента-мишени – обратной транскриптазы ВИЧ – они способны только после перехода в активную форму путем внутриклеточного фосфорилирования [2].

НИОТ-трифосфаты не только нарушают процесс репликации ВИЧ, но также подавляют полимеразу человека, так называемую « γ -полимеразу», необходимую для репликации митохондриальной ДНК (мтДНК). Угнетение этими препаратами γ -полимеразы приводит к снижению концентрации мтДНК – небольшой кольцевой молекулы, множество копий которой в норме содержится в каждой митохондрии, а в большинстве клеток человеческого организма их сотни. Поэтому подавление γ -полимеразы препаратами группы НИОТ приводит к уменьшению концентрации (истощению) мтДНК.

Биологическая роль мтДНК состоит в том, что она кодирует субъединицы ферментов дыхательной цепи, которые располагаются на внутренней мембране митохондрий.

Таким образом, снижая концентрацию мтДНК, НИОТ приводят к нарушению функции дыхательной цепи. Нормальное функционирование дыхательной цепи обязательное условие протекания многих метаболических процессов.

Главная задача дыхательной цепи – синтез АТФ (главного «энергоносителя» клетки) путем окислительного фосфорилирования [3].

Кроме того, дыхательная цепь обеспечивает утилизацию НАДН (восстановленного никотинамидадениндинуклеотида) и ФАДН (восстановленного флавинадениндинуклеотида) – конечных продуктов окисления жирных кислот. Этим объясняется мелко- и крупнокапельное внутриклеточное отложение триглицеридов, которое часто обнаруживается на фоне токсического действия НИОТ на митохондрии. Наконец, что немаловажно, нормальное функционирование дыхательной цепи необходимо для синтеза ДНК, поскольку синтез пиримидиновых нуклеозидов

de novo происходит при участии фермента, расположенного на внутренней мембране митохондрий – дигидрооротатдегидрогеназы.

Токсическое повреждение митохондрий развивается медленно. Изменения метаболизма митохондрий наблюдаются только после уменьшения концентрации мтДНК ниже определенной пороговой величины, что возможно только при длительном лечении НИОТ.

В связи с этим в первые месяцы приема антиретровирусной терапии (АРТ) симптомы повреждения митохондрий обычно не появляются [4].

Материал и методы

В нашей работе мы проанализировали ультрамикроскопическое строение митохондрий печени при прижизненной (первичной и повторной) биопсии печени у пациентки с ВИЧ-инфекцией, у которой на фоне приема АРТ развилась липодистрофия.

Пациентка С., 1977 года рождения, с 2009 года стоит на учете с диагнозом ВИЧ-инфекция, 1 клиническая стадия (CD4 – 745 кл/мкл), ХГС, ремиссия после курса лечения (пегинтрон+рибавирин). Предположительный путь инфицирования ВИЧ – половой.

Употребление наркотических препаратов отрицает. В октябре 2010 года в связи низким уровнем CD4 клеток назначена АРТ по схеме зидовудин/ламивудин и эфавир. Приверженность к терапии была хорошей.

В сентябре 2010 г. пациентке была выполнена пункционная биопсия печени для решения вопроса о назначении терапии ХГС.

При электронной микроскопии существенные изменения ультраструктуры отмечены со стороны митохондрий, выраженные в разной степени в разных гепатоцитах. В части клеток наблюдалось набухание матрикса и редукция крист митохондрий, в других – конденсация матрикса с расширением интракристных промежутков с локальным отслоением внутренней мембраны с образованием пузыря. В отдельных клетках регистрировалась более глубокая деструкция митохондрий: гипертрофия органелл с увеличением их размера в 10-12 раз превышающих размер обычных митохондрий, гиперплазия и неспецифическая ориентация крист с их локальной агрегацией.

В августе 2012 г. эфавир был заменен на лопиновир/ритоновир в связи с иммунологической неэффективностью (падение CD4 клеток). Клинически выраженные признаки липодистрофии у пациентки появились в октябре 2012 г.

При объективном осмотре отмечена заметная атрофия подкожного жира на лице, верхних и нижних конечностях, ягодицах при одновременном избыточном отложении жировой ткани в области живота и талии. Отмечено снижение массы тела на 5 кг в течение предшествующих 6 месяцев.

В феврале 2013 г. пациентке С. Была выполнена повторная биопсия печени. Митохондрии в большинстве гепатоцитов были немногочисленны, располагались в цитоплазме неравномерно, с преимущественной локализацией по периферии клеток, отличались гетерогенностью в разных гепатоцитах.

В большинстве гепатоцитов митохондрии характеризовались овальной формой, матриксом умеренной электронной плотности и небольшим количеством крист, часто неотчетливыми. Такие органеллы считаются промежуточными и отличаются умеренной биоэнергетической активностью.

В части гепатоцитов в подобных митохондриях отмечалось умеренное расширение интракристных промежутков, что указывает на некоторое функциональное напряжение органелл. В отдельных клетках митохондрии претерпевали частичную деструкцию с локальным отслоением внутренней мембраны с образованием электронно-светлых вакуолей.

При этом матрикс отличался умеренной электронной плотностью, а сохранившиеся кристы выявлялись отчетливо. В некоторых гепатоцитах, так же как и в первичной биопсии, наблюдались деструктивные органеллы, в которых была полностью разрушена внутренняя мембрана, сопровождаемая фрагментацией и агрегацией крист. Обнаруженные в первичной биопсии гигант-

ские митохондрии с глубокой деструкцией их внутренней структуры, размер которых в 10-15 раз превышал параметры обычных митохондрий, в повторной биопсии не выявлялись.

В это же время в связи с побочными эффектами была заменена АРТ. Назначены трувада+эфавир, а также проведено лечение реамберином – фармакологическим препаратом на основе янтарной кислоты. На фоне проводимой терапии и при последующем наблюдении отмечена положительная динамика состояния пациентки – явления ЛА значительно уменьшились.

Появилась подкожная жировая ткань на лице и верхних конечностях, уменьшились жировые отложения на животе. В настоящее время состояние пациентки С. удовлетворительное. Получен стойкий иммунологический ответ.

Электронно-микроскопическое изучение проводили в образцах биоптатов печени, фиксированных 1% раствором четырехокси осмия на 0,1 М буфере Миллонига, рН 7,4, при 40°C в течение 2 часов [5]. После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и в ацетоне образцы заливали в аралдит [6].

Из полученных блоков на ультрамикротоме Leica (Германия) готовили полутонкие срезы (400 нм) и окрашивали метиленовым синим. Препараты просматривали в световом микроскопе и выбирали однотипный участок для дальнейшего изучения ультраструктурных изменений. Ультратонкие срезы (35 нм) контрастировали 2%-ым раствором уранилацетата на 50% метаноле [7] и цитратом свинца по E.S. Reynolds [8]. Электронно-микроскопические препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) при увеличениях 10 000-60 000 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Для получения снимков использовался комплекс из цифровой камеры Olympus Mega View III (Германия) и программы для обработки изображений iTEM.

При морфометрии в каждой биопсии анализировали 20-40 полей зрения при увеличении 20 000 (площадь 1 поля зрения равна 31,59 мкм²) и 20 полей зрения при увеличении 60 000 (площадь 1 поля зрения равна 3,42 мкм²).

Статистическую обработку данных проводили с применением t-критерия Стьюдента для независимых выборок при помощи пакета Statistica 10.0 (Серийный номер AXAR207F394425FA-Q). Нормальность выборок проверяли критериями Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллифорса и Шапиро-Уилка [9].

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы 1, при токсическом воздействии на митохондрии печени АРЛС происходит увеличение оптической плотности матрикса митохондрии, что свидетельствует об их конденсации.

Согласно данным литературы эти изменения сопровождаются функциональными нарушениями митохондрий и предшествуют индукции опосредованных митохондриями механизмов программируемой гибели клетки имеющей место на конечной стадии митохондриального пути апоптоза.

Межмембранное пространство расширяется, за счёт чего общий объём митохондрий остаётся прежним.

Однако, как видно из таблицы, при повторной биопсии уменьшается минимальный диаметр митохондрий, что также подтверждает гипотезу их деструктуризации.

Наиболее важная в функциональном отношении структура митохондрий – внутренняя мембрана – на этом этапе сохранена, не смотря на то, что отмечается расширение крист. Конденсация и набухание митохондрий могут отражать функциональное напряжение клетки, но чаще нарастающее токсическое воздействие.

Эти изменения нередко обратимы, однако, прогрессируя, ведут к тяжелой деструкции митохондрий и последующему цитолизу.

Вероятным объяснением феномена липодистрофических изменений является митохондриальная токсичность или так называемая «гипотеза rol-γ» [10].

Согласно которой, для поддержания биоэнергетических функций во всех метаболически активных клетках должен происходить непрерывный синтез митохондриальной ДНК при участии

полимеразы- γ . Митохондриальная ДНК-полимераза- γ обладает как ДНК-, так и РНК-зависимой ДНК-полимеразной активностью.

Таблица 1

Результаты морфометрического анализа

Показатель	Первичная биопсия	Повторная биопсия	Достоверность
Средняя площадь митохондрий, мкм ²	0,20±0,006	0,19±0,005	NS
Средний периметр митохондрий, мкм	1,81±0,033	1,75±0,033	NS
Соотношение геометрических размеров больших и малых осей	1,83±0,026	1,83±0,026	NS
Фактор элонгации	1,90±0,031	1,90±0,033	NS
Оптическая плотность матрикса	95,82±0,560	104,34±0,490	p<0,0001
Диаметр эквивалентного круга, мкм	0,48±0,006	0,46±0,007	NS
Диаметр митохондрий максимальный, мкм	0,68±0,013	0,66±0,013	NS
Диаметр митохондрий минимальный, мкм	0,39±0,006	0,37±0,006	p=0,021
Диаметр митохондрий средний, мкм	0,60±0,011	0,58±0,011	NS
Наиболее удаленная точка от центра митохондрии, средний размер, мкм	0,49±0,007	0,47±0,007	NS
Наиболее удаленная точка от центра митохондрии, минимальный размер, мкм	0,36±0,005	0,35±0,005	NS
Наиболее удаленная точка от центра митохондрии, максимальный размер, мкм	0,68±0,013	0,66±0,013	NS
Коэффициент сферичности	0,37±0,008	0,37±0,009	NS
Форм-фактор (степень митохондриальных разветвлений)	0,75±0,006	0,75±0,006	NS
Средняя длина крист в одной митохондрии, мкм	0,15±0,005	0,15±0,004	NS
Расширение крист	0,016±0,0003	0,020±0,001	P<0,0001

Последняя, вероятно, является мишенью для активности обратной транскриптазы ВИЧ, которая ингибируется под действием НИОТ. НИОТ-индуцированная митохондриальная дисфункция объясняется различными механизмами: конкурентным ингибированием с последующим истощением мтДНК, образованием мтДНК с разрывами цепей, изменением активности митохондриальных ферментов.

Выводы

Таким образом, на фоне токсического воздействия на гепатоцит антиретровирусных лекарственных средств, в ткани печени формируется комплекс структурных изменений митохондрий, что еще более объективно свидетельствует о развитии дегенеративных нарушений в данных органеллах при лекарственной терапии ВИЧ-инфекции.

Наблюдаемая ассоциация формирования структурно-функциональных нарушений митохондрий с развитием липодистрофии, как осложнения АРТ позволяет предполагать участие митохондриальной дисфункции в механизмах развития дислипидемии.

Можно выделить несколько основных механизмов возникновения митохондриальной токсичности:

- прямое ингибирование митохондриальной ДНК-полимеразы;
- влияние на цикл Кребса и β -окисление жирных кислот;
- влияние на эффективность карнитин-зависимого транспорта жирных кислот через мембрану митохондрий;

- возможное влияние на АМФ-активируемую протеинкиназу, контролирующую энергетический баланс клетки,
- разобщением процессов окислительного фосфорилирования и индукцией апоптоза, проявляющиеся соответствующими изменениями в морфометрических показателях митохондрий.

Литература

1. Friedman, J.R. Mitochondrial form and function / J.R. Friedman, J.Nunnari // Nature. – 2014. – Vol. 505. – P. 335–343.
2. Guimaraes, C.A. Programmed cell death: apoptosis and alternative deathstyles / C.A. Guimaraes, R. Linden // Eur. J. Biochem. – 2004. – Vol. 217. – P. 1638–1650.
3. Moyle, G. Mitochondrial toxicity: myths and facts / G.Moyle // J. HIV Ther. – 2004. – Vol. 9, N. 2. – P. 45–47.
4. Ивашкин, В.Т. Механизмы иммунной толерантности и патологии печени / В.Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, коло-проктологии. – 2009. – №2. – С.2–13.
5. Millonig, G.A. Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation / G.A. Millonig // J. Appl. Physics. – 1961. – V.32. – P.1637-1643.
6. Glauert, R.H. Araldite as embedding medium for electron microscopy / Glauert, R.H. //J.Biophys. Biochem.Cytol. – 1958. – V.4. – P.409-414.
7. Watson, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals / M.L. Watson // J. Biophys. Biochem.Cyt. – 1958. – V.4. – P.475-478.
8. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // J. Cell. Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.
9. Лакин, Л.С. Биометрия: учеб.пособие для ВУЗов биолог. спец. / Л.С. Лакин // 4-е изд. – Москва: Высшая школа, 1990. – 252 с.
10. Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy / K.Brinkman et al. // Lancet. – 1999. – Vol. 9184, №354. – P.1112-1115.

КОММУНИКАЦИОННО-ТРОФИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ОРГАНИЗМА И АНТРОПОФАГИЯ

Литвиненко Л. М.

Кафедра анатомии, Первый Московский медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва, Россия
Corresponding author: Llm555@yandex.ru

Abstract

COMMUNICATION-TROPHIC SYSTEM OF THE BODY AND ANTHROPOPHAGY

In the article is described the communication-trophic system of the human body, which integrates all existing systems in it. Communication-trophic system is divided into central and peripheral parts. To the central part of the communication system is the brain and spinal cord; to the central part of the trophic system are the liver, lungs and heart. The peripheral part of the communication-trophic system is general and presents by the neurovascular complexes of the human body, along which and under the influence of which all organs and tissues of the classical system of the body are formed. First in the process of development is laid trophic system, which in future will be to provide the body with the nutrients immediate, medium remote perspective in the form of the deposit of substances in the liver and in other organs. At the same time laid reproductive system providing your own body (if necessary) and other biological objects (food chain) by nutrients in the long perspective.

The mechanism of formation anthropophagy, which in the norm is depressed, was shown.

Key words: communication, trophism, system, organism, anthropophagy, neurovascular complexes.

Мы не редко слышим, как говорят: «она его поедом ест», «он сжирает ее». Мамаша покусывает своего грудного ребенка за пятку и в шутку говорит: «я тебя съем». Любящие говорят друг другу: «какой или какая вкусная, сладкая...».