

УДК 616.36-076.5:576.311.347

КЛИНИЧЕСКАЯ ЦИТОЛОГИЯ ПЕЧЕНИ: МИТОХОНДРИИ**В. П. Андреев (andrvp@yandex.ru), В. М. Цыркунов (tvm111@mail.ru),
Р. И. Кравчук (cnil@grsmu.by), М. Н. Курбат (vwmisha@mail.ru)****УО «Гродненский государственный медицинский университет» Гродно, Беларусь**

Введение. В последние годы изменились представления о митохондриях (МХ), ранее рассматриваемых только в качестве «энергетических блоков» клетки, вырабатывающих АТФ. МХ являются одной из мишеней атаки HCV при хроническом гепатите С (ХГС).

Цель исследования – представить морфологическую характеристику МХ печени при ХГС с применением оригинальной методики фиксации ткани.

Материал и методы. Использованы методы световой микроскопии полутонких срезов по усовершенствованной методике фиксации и электронной микроскопии ультратонких срезов. Для получения снимков применены комплекс из цифровой камеры и программа для обработки изображений Olympus Mega View III (Германия).

Результаты. В результате исследований выделены следующие варианты изменений МХ в гепатоцитах: набухание, конденсация (уплотнение) матрикса, нарушение структуры крист; нарушение митохондриального слияния; митохондриального деления и фрагментация; разрушение МХ путем образования митофаголизосомы. Приведены иллюстрации макроаутофагии, при которой происходит дегградация крупных органелл клетки и крупных белковых агрегатов с образованием аутофагосомы. Изучены иницирующие звенья запуска митохондриального пути апоптоза у ВИЧ-инфицированных пациентов с ХГС, находящихся на антиретровирусной терапии.

Заключение. Визуализация МХ в биоптате печени, распределение их в цитоплазме гепатоцита, количество, вариабельность и мониторинг изменений – важные критерии оценки функционального состояния печени в условиях вирусного поражения. Осмиевый фиксатор имеет преимущества перед существующими реагентами.

Ключевые слова: печень, митохондрии, фиксация, изменения, визуализация.

CLINICAL CYTOLOGY OF THE LIVER: MITOCHONDRIA**V. P. Andreev, V. M. Tsyrcunov, R. I. Kravchuk, M. N. Kurbat****Educational Institution “Grodno State Medical University”, Grodno, Republic of Belarus**

Background. In recent years, ideas about mitochondria (MX) previously considered only as «energy blocks» of the cell that produce ATP have changed. MX is one of the targets of the HCV attack in chronic hepatitis C (CHC).

The objective of the study is to present the morphological characteristic of liver MX in chronic hepatitis C using the original method of tissue fixation.

Materials and methods. We employed methods of light microscopy of semi-thin sections with the use of improved methods of fixation and electron microscopy of ultrathin sections. To take pictures, a complex comprising a digital camera and the image processing program Olympus Mega View III (Germany) were used.

Results. As a result of the research, the following variants of changes in hepatocyte MX were identified: swelling, condensation (compaction) of the matrix, disruption of the crista structure; disruption of mitochondrial fusion; mitochondrial division and fragmentation; destruction of MX by the formation of mitophagolysosome. The illustrations of macroautophagy, in which the degradation of large cell organelles and large protein aggregates with the formation of autophagosome occurs, are given. The initiating links of the mitochondrial apoptosis pathway have been studied in HIV-infected patients with chronic hepatitis C who are on antiretroviral therapy.

Conclusion. The visualization of MX in liver biopsy, their distribution in the hepatocyte cytoplasm, the number, variability and monitoring of changes are important criteria for assessing the functional state of the liver under viral damage. The osmium fixative has obvious advantages over other existing reagents.

Keywords: liver, mitochondria, fixation, changes, visualization.

Введение

Митохондрии (МХ) – греч. mitos – нить, chondros – зернышко, крупинка) – самые крупные, окруженные двойной мембраной органеллы, являющиеся центром промежуточного обмена веществ и местом синтеза аденозинтрифосфата (АТФ) в клетке. В 1850 г. Р. Л. Кёлликер назвал МХ саркосомами, хотя большинство источников указывают на открытие МХ Р. Альтманом

в 1894 г., который назвал их биопластами, а К. Бенда в 1897 г. дал им существующее название МХ [1], поскольку они видны в виде «нитей» и «зернышек», как показано на наших рисунках 1 и 2.

МХ в большом количестве (до 1000 и более в зависимости от расположения гепатоцита в дольке), занимают до 22% объема цитоплазмы, а их электрон-транспортная система потребляет до 99% кислорода в клетке [2].

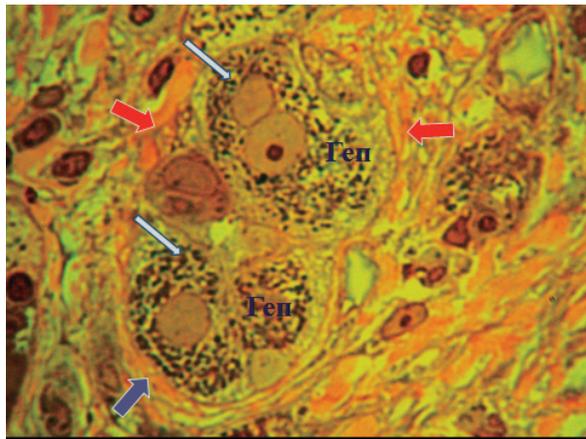


Рисунок 1. – МХ (белые стрелки) в гепатоцитах (Геп), с гиперплазией в виде зернышек (темные точки), окружены волокнами соединительной ткани (красные и синяя стрелки). Окраска: азур II, основной фуксин. $\times 1000$

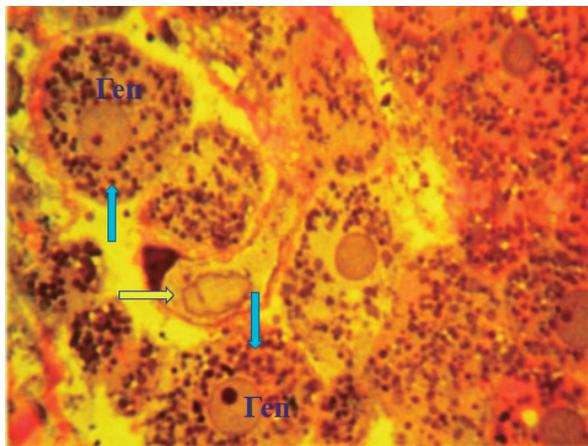


Рисунок 2. – МХ (синие стрелки) в гепатоцитах (Геп), многочисленные, набухшие. Дендритная клетка (желтая стрелка) в просвете синусоида. Окраска: азур II, основной фуксин. $\times 1000$

Форма МХ варьирует от почти сферической до очень вытянутой, иногда образуя разветвления (рис. 3 и 4).

Отличием МХ от других органелл является наличие у них собственных ДНК (от 1 до 50 небольших одинаковых циклических молекул) и рибосом, которые несколько меньше цитоплазматических рибосом и видны в виде мелких гранул. Эта система автономного синтеза белков обеспечивает образование 5% митохондриальных белков. МХ в клетке постоянно обновляются, продолжительность их жизни примерно 10 суток [3].

Главная функция МХ – завершение окислительного распада питательных веществ и образование за счёт выделяющейся энергии АТФ – временного аккумулятора энергии в клетке. Наиболее известны два процесса: цикл Кребса – распад ацетил-КоА, которым заканчивается разрушение почти всех веществ, и окислительное фосфорилирование – образование АТФ в ходе

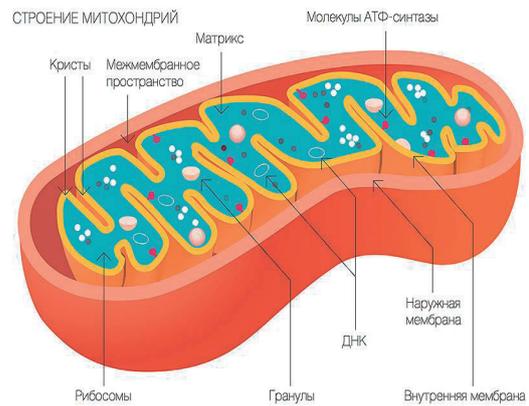


Рисунок 3. – Строение МХ – схема (<https://www.kommersant.ru/gallery/3343874>, 08.08.2018)

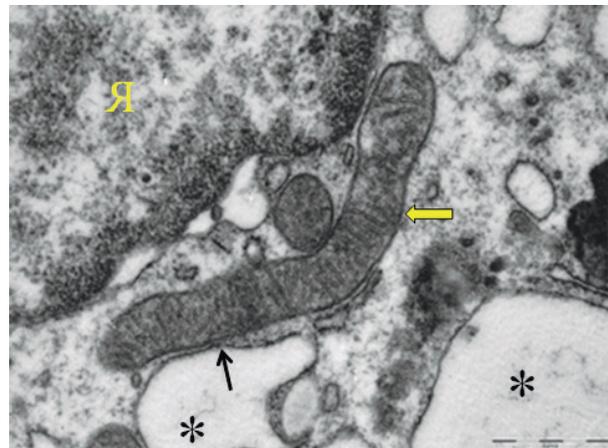


Рисунок 4. – МХ (желтая стрелка) вблизи ядра (Я) гепатоцита. Умеренная плотность матрикса и хорошая сохранность радиально ориентированных крист. Место сближения мембраны расширенной гладкой эндоплазматической сети (звездочка) и МХ обозначены черной стрелкой. $\times 50000$

переноса электронов (и протонов) на кислород. Перенос электронов производится по цепи промежуточных переносчиков дыхательной цепи, вмонтированной в кристы МХ. Здесь же находится и система синтеза АТФ (АТФ-синтаза). Другие процессы в МХ – это синтез мочевины, распад жирных кислот и пирувата до ацетил-КоА [4].

МХ выступают главными потребителями поступившего в клетку кислорода. В процессе эволюции у человека выработались разные защитные механизмы от токсического и деструктивного действия свободного кислорода. Первая линия антиоксидантной защиты в клетке представлена митохондриальным дыханием, в процессе которого нейтрализуется значительная часть активных форм кислорода (АФК) и происходит перекисное окисление липидов (ПОЛ) в мембранах МХ. Для инактивации АФК и торможения ПОЛ служат такие естественные соединения, как глутатион, аскорбиновая кислота и α -токоферол, способные уменьшить количество АФК (вторая

линия защиты). Третья линия защиты – антиперекисная, на которой образовавшиеся перекиси разрушаются такими ферментами, как супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза [5].

Последние два десятилетия принесли в область изучения МХ ряд достижений, изменивших представления о МХ, ранее рассматриваемых только в качестве «энергетических блоков» клетки, вырабатывающих АТФ. В 1996 г. установлено, что МХ являются центральным звеном в апоптозе клеток и в других процессах: гомеостазе кальция, производстве АФК, аутофагии, метаболизме аминокислот, липидов и глюкозы, синтезе многих других клеточных компонентов [6, 7]. МХ признаны ключевыми структурами в процессах деления и дифференцировки клеток, в их антивирусной защите, выполнении основных клеточных функций, влиянии на процессы старения, онкогенеза и нейродегенерации [8, 9]. Дефекты МХ лежат в основе многих патологических процессов, в том числе ряда инфекционных болезней, включая патогенез HCV-инфекции [10-12].

Экспериментально установлено, что МХ являются одной из многих мишеней атаки HCV при хроническом гепатите С (ХГС). Было показано, что экспрессия белков HCV как в индуцируемой системе, так и в клетках Huh 7.5, трансфицированных HCV, приводит к глубоким изменениям МХ, включающим: перегрузку внутримитохондриального кальция ($mtCa^{2+}$); отвод митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), что коррелирует с ингибированием клеточного дыхания и активностью комплекса I (НАДН-дегидрогеназы); перепроизводством АФК и азота (RO/NS) [13, 14].

Пока установлены 4 факта взаимодействия HCV с МХ: митохондриальные аномалии и увеличение производства реактивных форм кислорода (ROS – Reactive oxygen species) в гепатоцитах, инфицированных HCV; наличие непосредственной связи белков HCV с МХ или митохондриальными мембранными фракциями; изменение $mtCa^{2+}$, приводящее к избыточной продукции митохондриального ROS, что может быть прекращено блокированием накопления митохондриального $mtCa^{2+}$; расщепление HCV сигнального белка MAVS на поверхности МХ, приводящее к блокаде антивирусного иннантно-го иммунитета (рис. 5).

Цель исследования – представить морфологическую характеристику МХ печени при ХГС с применением оригинальной методики фиксации ткани печени.

Материал и методы

Биоптаты печени 15 пациентов с ХГС были получены путем проведения слепой аспирационной биопсии после получения от пациентов

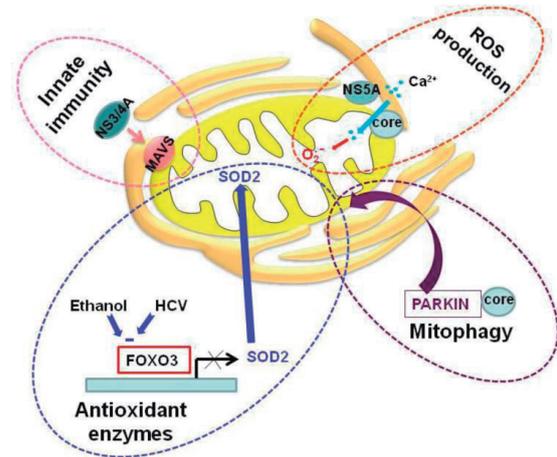


Рисунок 5. – Механизмы, посредством которых HCV модифицирует митохондриальную функцию (Ting Wang, Steven A. Weinman, 2013) [15]

письменного информированного согласия.

Для световой микроскопии полутонких срезов образцы биоптата печени пациентов размером 0,5×2 мм фиксировали методом двойной фиксации: вначале – по методике Sato Taizan [16]; затем образцы ткани в течение 1 часа дополнительно фиксировали в 1% осмиевом фиксаторе, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере Зёренсена (pH 7,4). Для лучшего выявления внутриклеточных структур и межклеточного вещества на полутонких срезах в 1% четырехокись осмия добавляли дихромат калия ($K_2Cr_2O_7$) или кристаллы хромового ангидрида [17]. После дегидратации образцов в серии спиртовых растворов возрастающей концентрации и ацетоне они помещались в преполимеризованную смесь бутилового метакрилата и стирола, полимеризовались при 550С. Полутонкие срезы (толщиной 1мкм) последовательно окрашивали азур II, основным фуксином. Микрофото получали с использованием цифровой видеокамеры (Leica FC 320, Германия).

Электронно-микроскопическое изучение проводили в образцах биоптатов печени размером 0,5×1,0 мм, фиксированных 1% раствором четырехокиси осмия на 0,1 М буфере Миллонига, pH 7.4, при +40С в течение двух часов [18]. После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и ацетоне образцы заливали в аралдитовую эпоксидную смолу [19, 20]. Из полученных блоков на ультрамикротоме Leica EM VC7 (Германия) готовили полутонкие срезы (400 нм) и окрашивали метиленовым синим. Срезы исследовали в световом микроскопе и выбирали однотипный участок для дальнейшего изучения ультраструктурных изменений. Ультратонкие срезы (35 нм) контрастировали 2% раствором уранилацетата на 50% метаноле [21] и цитратом свинца по E. S. Reynolds [22]. Препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011

(JEOL, Япония) при увеличениях 10 000-60 000 при ускоряющем напряжении 80 кВт. Для получения снимков использовался комплекс из цифровой камеры Olympus Mega View III (Германия) и программы для обработки изображений iTEM (Olympus, Германия).

Результаты и обсуждение

В гепатоцитах у пациентов с ХГС МХ были разной формы и разные по размерам, преимущественно округлой формы диаметром до 1 мкм (рис. 6). Среди основной популяции органелл встречались МХ удлиненной или Y-образной формы. МХ имели характерное строение, содержали небольшое число узких, неупорядоченно ориентированных коротких крист и умеренно-плотный гранулированный матрикс.

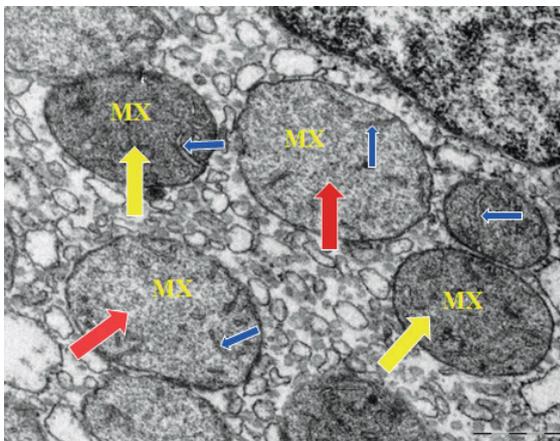


Рисунок 6. – МХ округлой формы, содержащие умеренно плотный (желтые стрелки) или просветленный (красные стрелки) матрикс, разное число неупорядоченно ориентированных коротких крист (синие стрелки). $\times 40\ 000$

У здорового человека можно встретить разновидности гигантских МХ, имеющих диаметр до 5 мкм, МХ с множеством мелких крист и длинные МХ с включениями в виде параллельных, плотно расположенных филаментов, образующих паракристаллические структуры, состоящие из фосфолипидов и протеинов [23]. В матриксе МХ часто обнаруживаются электронно-плотные гранулы диаметром до 40 нм, являющиеся соединениями кальция и фосфора (рис. 7) [24]. МХ в гепатоцитах располагаются в околоядерной зоне, на синусоидальном и билиарном полюсах. При накоплении гликогена они оттесняются на периферию клетки [25]. При HCV-инфекции нами зафиксирована транслокация МХ в околоядерное пространство (рис. 8).

К основным проявлениям митохондриальной дисфункции относят следующие: снижение синтеза АТФ; продукция АФК; активация механизмов клеточной гибели, включая апоптоз, аутофагию и некрозоподобные изменения [26]. Митохондриальная дисфункция, характерная

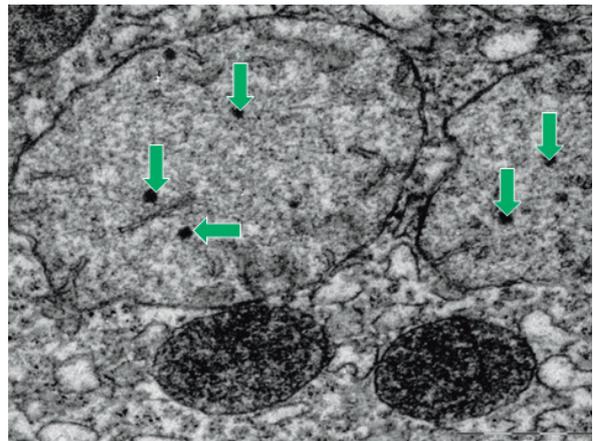


Рисунок 7. – Электронно-плотные матриксные гранулы (зеленые стрелки) диаметром 25-40 нм, представляющие соединения кальция и фосфора. $\times 60\ 000$

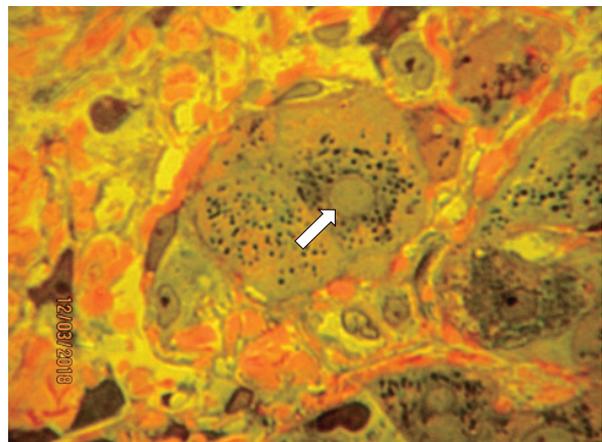


Рисунок 8. – Транслокация (перемещение) МХ в околоядерное пространство; ядро гепатоцита обозначено стрелкой. Окраска: азур II, основной фуксин. $\times 1000$

для HCV-инфекции, имеет сложный механизм, который определяется разнообразием вирусных белков, негативно влияющих на функцию МХ и гепатоцитов в целом [27, 28]. Избыточная активность митоаутофагических процессов приводит к снижению численности МХ в гепатоцитах (рис. 9).

Различают следующие структурные изменения МХ: сжатие и уплотнение матрикса; увеличение объема, фрагментация и разрушение крист; разрыв наружной и внутренней мембран; образование разветвленных и гигантских МХ; накопление пластинчатых крист; кальцификация МХ [29].

Результаты наших исследований позволили представить следующие варианты изменений МХ в гепатоцитах.

1. Набухание, конденсация (уплотнение) матрикса, нарушение структуры крист. Полость, ограниченная внутренней мембраной, называется митохондриальным матриксом, в котором располагается огромное количество ферментов,

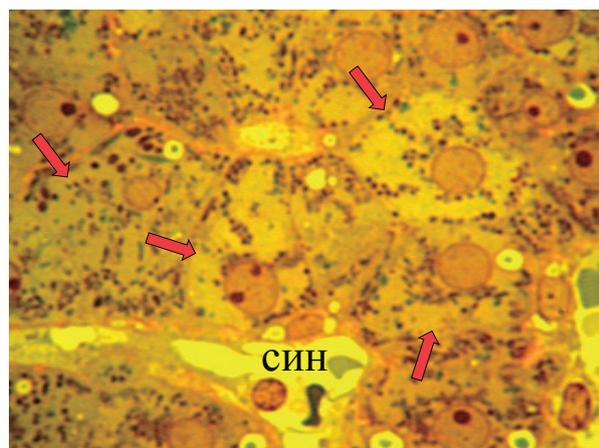


Рисунок 9. – Участки (красные стрелки) частичного отсутствия МХ в цитоплазме гепатоцитов, примыкающих к синусоиду (СИН). Окраска: азур II, основной фуксин. $\times 1000$

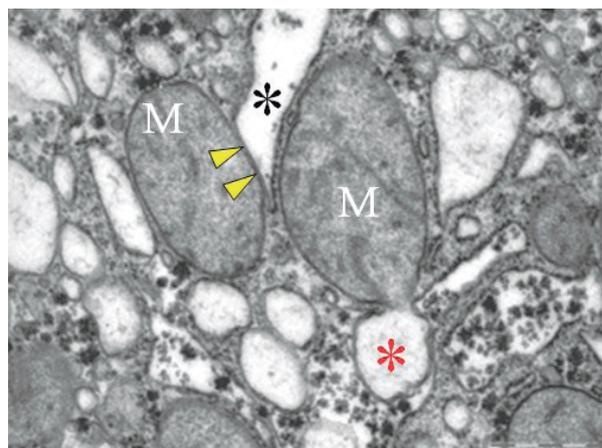


Рисунок 11. – Набухание и очаговое просветление матрикса МХ. Образование в МХ полости (красная звездочка), свободной от матрикса. Тесный контакт МХ (желтые наконечники) с ГлЭС (черная звездочка). $\times 50\ 000$

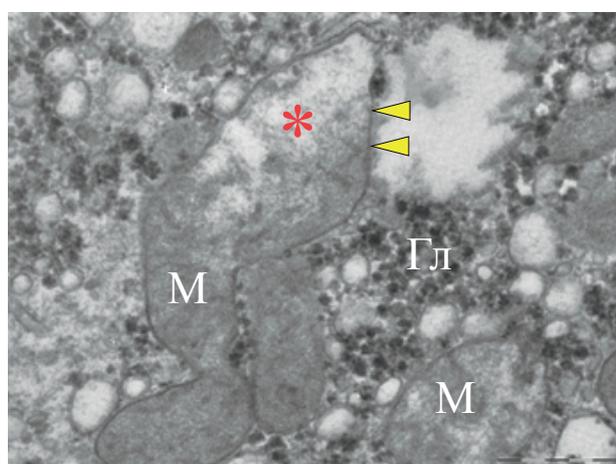


Рисунок 10. – Набухание и локальное просветление (красная звездочка) внутреннего содержимого аномальной МХ вблизи контакта с липидной каплей (желтые наконечники стрелок). $\times 50\ 000$

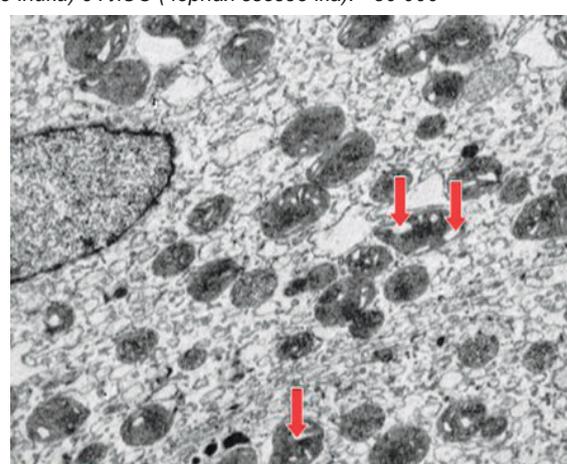


Рисунок 12. – Высококонденсированный матрикс МХ в печени пациента с ХГС. Расширение интракристаллических промежутков с формированием внутримитохондриальных вакуолей (красные стрелки). $\times 15\ 000$.

участвующих в окислении жирных кислот, углеводов, в цикле трикарбоновых кислот (в цикле Кребса).

При электронной микроскопии в гепатоцитах, пораженных HCV, встречались аномальные формы некоторых МХ, значительное увеличение их площади за счет набухания, пятнистого просветления матрикса (рис. 10), перерастающего в полости, свободные от матрикса (рис. 11, 12). Отмечено увеличение участков тесного соприкосновения мембран гладкой эндоплазматической сети (ГлЭС) с наружной мембраной МХ (рис. 11). Особенностью изменений стало выявление в рядом расположенных гепатоцитах выраженного полиморфизма МХ, заключающегося в их количестве, разной степени конденсации матрикса и ассоциации с гладкой эндоплазматической сетью (ГлЭС, рис. 12, 13).

Основными процессами, регулирующими количество и качественные характеристики МХ, являются: слияние двух или нескольких МХ, ветвление; деление (симметричное разделение

МХ на две) и фрагментация (асимметричное разделение МХ); образование сфероидных форм; направленное изменение внутриклеточной локализации; разрушение поврежденных МХ через аутофагию [32, 36].

Каждый из этих процессов имеет решающее значение для поддержания здоровой популяции МХ в клетке. Морфология МХ основана на динамических процессах слияния, деления и фрагментации.

2. Митохондриальное слияние. Несбалансированное деление приводит к фрагментации МХ, а несбалансированное слияние – к появлению элонгированных (удлиненных) органелл, нередко причудливой формы (рис. 14, 15). При HCV-инфекции нормальные удлиненные трубчатые МХ были зафиксированы в неинфицированных клетках, а фрагментированные МХ с потерей крист – в инфицированных клетках [10].

Митохондриальное слияние, осуществляемое за несколько секунд, позволяет динамически перестраивать компоненты мембран и со-

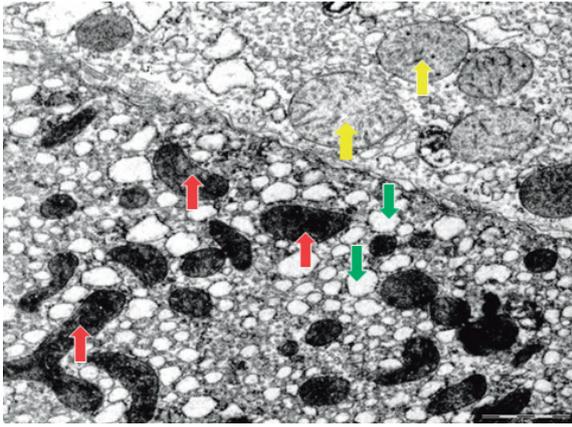


Рисунок 13 – Гетерогенность 2 гепатоцитов по количеству и структуре МХ: снизу – полиморфизм МХ (красные стрелки) с высококонденсированным, сжатым матриксом с завуалированными кристами; вверху – МХ (желтые стрелки) с набухшим, электронно-светлым матриксом и неупорядоченными кристами. Вакуолизация цитоплазмы за счет расширения профилей ГлЭС (зеленые стрелки). $\times 8\ 000$

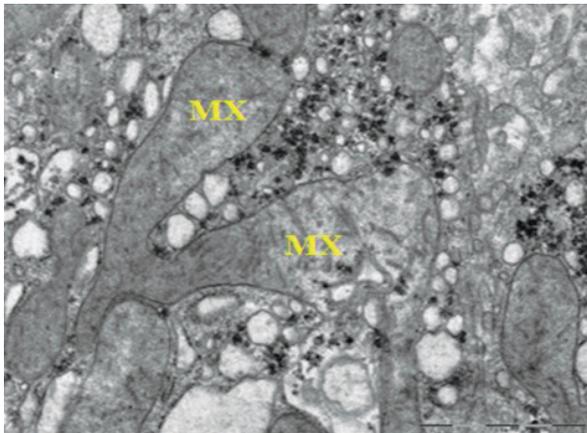


Рисунок 14. – Разветвленные мега МХ. $\times 30\ 000$

держимое матрикса между отдельными МХ за счет обмена митохондриальной ДНК, белками и метаболитами из здоровых и поврежденных МХ. Образование удлинённых и разветвленных МХ защищает клетку от апоптоза.

Слияние МХ в клетках осуществляется с помощью двух гуанозинтрифосфатаз, локализованных на наружной мембране МХ. МХ, лишённые в результате мутаций этих молекул, имеют значительную степень слияния МХ [30, 31]. МХ, будучи относительно автономными органеллами, постоянно делятся или сливаются в зависимости от потребностей клетки. Слияние наружных мембран митохондрий контролируется белком митофузином, тогда как слияние внутренней мембраны регулируется трансмембранным протеином с ГТ-Фазной активностью OPA1, локализованным во внутренней митохондриальной мембране [6].

3. Митохондриальное деление и фрагментация. Продолжительность жизни МХ – 10-13 дней. Обновление МХ происходит поперечным деле-

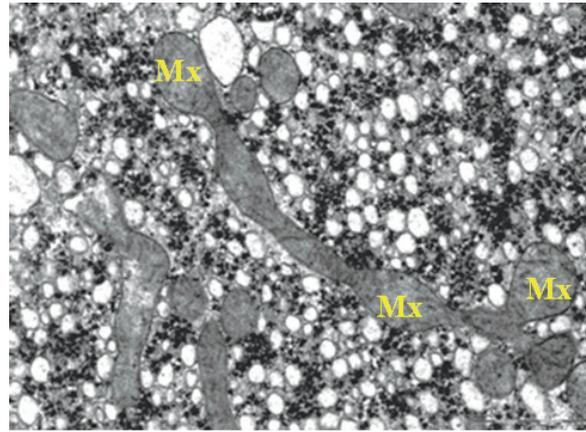


Рисунок 15. – Удлиненная разветвленная Мх причудливой формы, окруженная интенсивно развитой сетью ГлЭС и гранулами гликогена. $\times 25\ 000$

нием, начинающимся с образования кольцевой бороздки на внутренней мембране. Удвоение МХ происходит при подготовке клетки к делению в G2-периоде интерфазы. На основе морфологической 2D-картины, видной при трансмиссионной электронной микроскопии, выделяют 2 способа деления МХ [32, 33]. Один из них представляет «pinching» («перехватывание», «отщипывание»), при котором сужение МХ на определенных поверхностных участках приводит к их истончению (рис. 16).

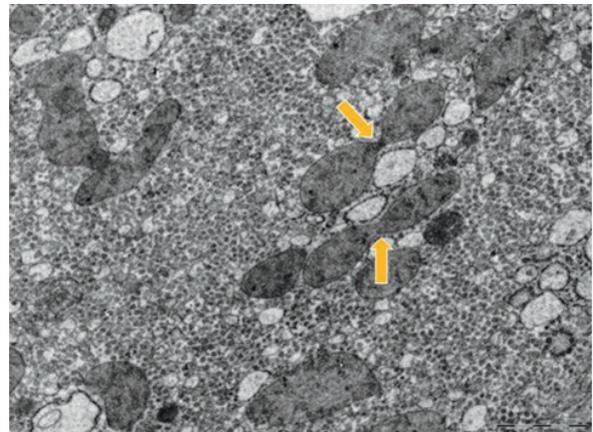


Рисунок 16. – Увеличенное количество делящихся форм МХ по типу «pinching» (указано стрелками). $\times 20\ 000$

При встрече мембран с противоположных сторон происходит деление МХ. При этом МХ приобретали гантелевидную форму и учитывались нами как делящиеся (рис. 17). Деление МХ сопровождается распределением митохондриального генома между дочерними МХ.

Второй вид деления включает образование перегородки из внутренней мембраны, пересекающей всю ширину МХ. Последующая инвагинация наружной мембраны приводит к разделению МХ. Эта разновидность деления МХ нами регистрировалась более часто (рис. 18, 19).

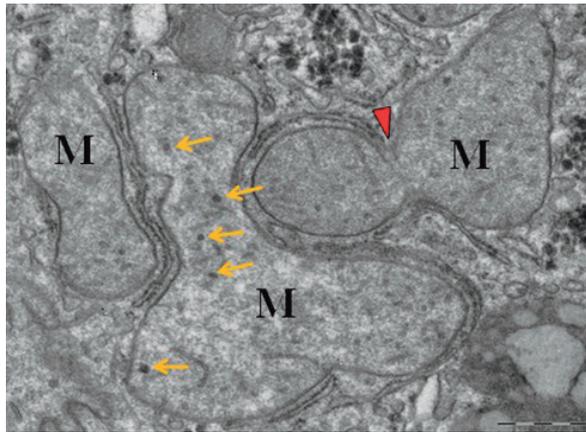


Рисунок 17. – МХ (M), делящаяся с дезориентированными кристами и матричными гранулами (оранжевые стрелки). Место предполагаемого деления МХ – красный наконечник стрелки. $\times 40\ 000$

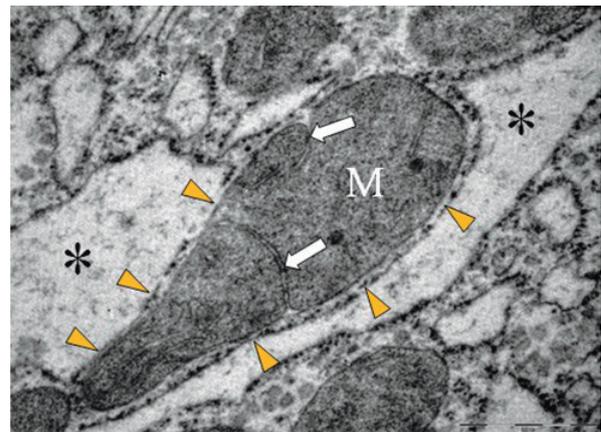


Рисунок 19. – Протяженный контакт (оранжевые наконечники стрелок) расширенного ЭР (звездочки) с МХ (M). Начало фрагментации МХ (белые стрелки) с признаками нарушенной ультраструктурной организации. $\times 60\ 000$

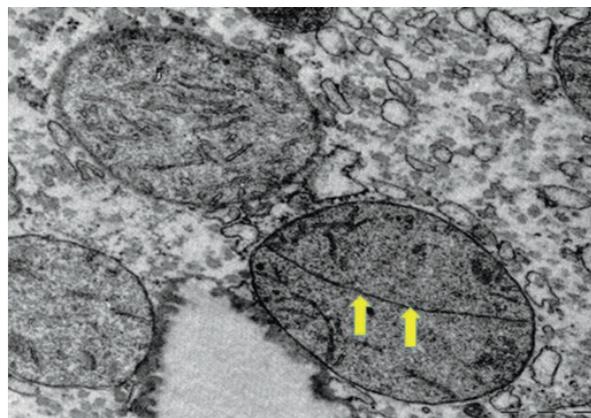


Рисунок 18. – Образование перегородки внутри МХ. $\times 40\ 000$

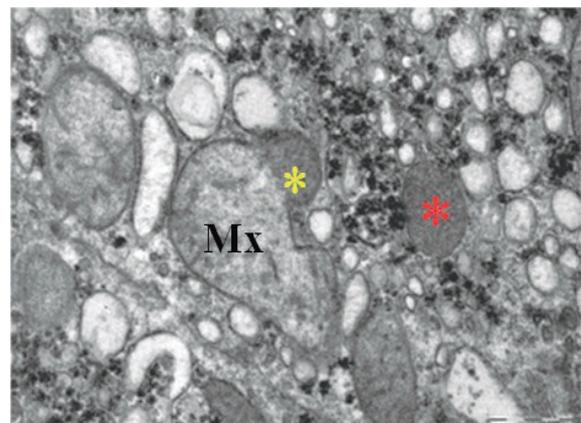


Рисунок 20. – МХ в состоянии фрагментации. Отделяющийся фрагмент отмечен желтой звездочкой. Фрагментированная МХ – красной звездочкой. $\times 40\ 000$

При фрагментации МХ образуются небольшие фрагменты, не содержащие митохондриальную ДНК, легко утилизируются (рис. 20, 21).

Процесс фрагментации порождает два подмножества дочерних МХ: с увеличенным и уменьшенным мембранным потенциалом. Дочерние МХ с высоким мембранным потенциалом способны приступать к слиянию, а деполяризованные МХ удаляются с помощью митофагии.

4. Разрушение МХ путем образования митофаголизомы. Для осуществления функций МХ требуется около 700 различных белков, но только 5% из них закодированы в собственном геноме МХ. Остальные белки импортируются из цитоплазмы. Вновь синтезированные белки при подготовке к импорту связываются с другим классом цитозольных белков – шаперонами, которые обеспечивают правильное сворачивание (фолдинг) и окончательную конформацию многих синтезированных белков.

Селективная деградация МХ с помощью аутофагии (утилизации) МХ или митофагии является эволюционно закрепленным явлением сегрегации (отделения), расщепления и вторичного использования собственного клеточного мате-

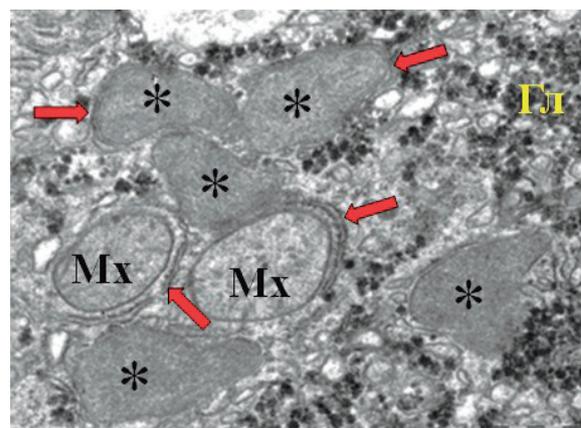


Рисунок 21. – Кластер фрагментированных МХ (звездочки) с уплотненным матриксом. Формирующиеся изолирующие мембраны (фагофоры) обозначены стрелками. $\times 40\ 000$

риала [34]. Выделяют три вида аутофагии: макроаутофагию, микроаутофагию и шаперон-медиаторную аутофагию.

Аутофагия играет важную роль при поражении печени, при которых нарушается фолдинг белков [35, 36]. Недостаточность аутофагии приводит к ускоренному старению клетки, избыточ-

ная – к дефициту клеточных ресурсов и гибели клетки. Считается, что старение клетки сопровождается ее гипертрофией, аутофагия же может служить компенсаторным механизмом, обеспечивающим определенное соотношение объема ядра и цитоплазмы.

NS5A HCV вызывает митохондриальную фрагментацию и стимулирует митофагию, чтобы ингибировать опосредованный МХ апоптоз. Эта фрагментация происходит в то время, когда BCL2-associated X protein (Bax) и регулятор апоптоза (Bcl2) транслоцируются в МХ перед активацией каспаз. Однако роль фрагментации МХ в апоптозе не является универсальной. В клеточной гибели большое значение играют ионы Ca^{2+} , переходящие из эндоплазматического ретикулума (ER/ЭР) в МХ, вызывающие их повышенную проницаемость и активацию каспаз [37].

Ключевую роль в гомеостазе липидов и Ca^{2+} , в иницировании аутофагии, митохондриального деления играют участки соприкосновения МХ и ER/ЭР или мембраны ER/ЭР, ассоциированные с МХ, называемые MAM (mitochondria-associated ER membranes), органеллы находятся на расстоянии от 10 до 50 нм [38].

При ХГС нами установлено заметное нарушение MAM, выражающееся в значительном увеличении числа и площади этих контактов (рис. 22).

Известно, что дефектное связывание ER/ЭР с МХ сопровождается повышенной продукцией белков MAM, увеличением потока Ca^{2+} от ER/ЭР к МХ, одновременным увеличением митохондриального окислительного стресса и нарушении их морфологии.

Из литературы известно, что в гепатоцитах, инфицированных HCV, 40% митохондриальной мембраны прикрепляется к ER/ЭР (по сравнению с менее чем 20% в соответствующих здоровых гепатоцитах) [10, 28].

Активация аутофагии МХ приводит к накоплению липофусцина в лизосомах – продукта неполной утилизации компонентов. Из всех форм аутофагии наибольшим защитным эффектом является процесс удаления тех МХ (митофагия), у которых нарушена проницаемость мембран, в результате чего происходит интенсивная генерация АФК и синтез аномально свернутых белков (рис. 23, 24).

Известна цепочка белков-медиаторов, участвующих в убиквитировании (мечении) поврежденных МХ, предназначенных для митофагии. Повреждение МХ улавливается сенсором трансмембранного потенциала, включающим киназу PINK1. Киназа постоянно транспортируется на внешнюю мембрану МХ и там ферментативно расщепляется. При падении трансмембранного потенциала она накапливается в мембране и способствует убиквитированию [39].

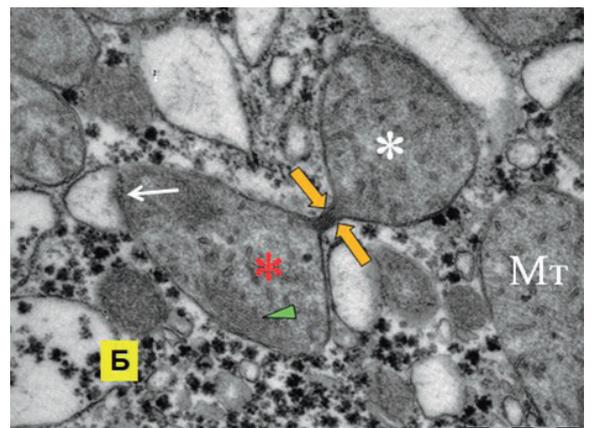
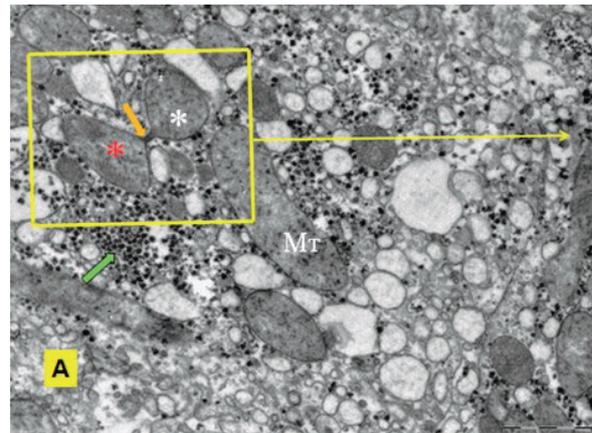


Рисунок 22. – Фрагмент гепатоцита, где наблюдается интенсивная гиперплазия ГлЭС (рис. А). Рамкой выделена делящаяся МХ (рис. Б), внизу оранжевые стрелки указывают на перетяжку, место полного бинарного деления МХ. Белой звездочкой обозначена та часть МХ, в которой сохранена ультраструктурная организация, красной – фрагмент МХ с редукцией крист и наличием кристаллоидной структуры (зеленая стрелка). Белая стрелка указывает на тесную ассоциацию МХ с контуром ГлЭС (MAM). $\times 250\ 000$ и $50\ 000$

Митохондриальная фрагментация во время апоптоза может быть результатом чрезмерного деления и/или недостаточного слияния.

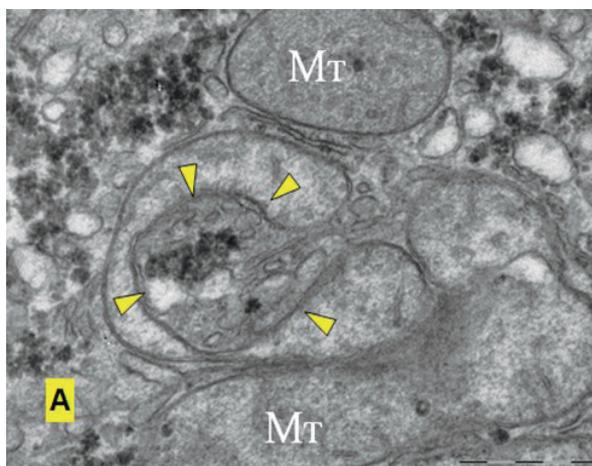


Рисунок 23. – А: формирование сферы внутри МХ (желтые наконечники стрел) путем огибания МХ цитоплазматическими компонентами (цитозоль, элементы эндоплазматической сети, везикулы, гранулы гликогена). $\times 50\ 000$

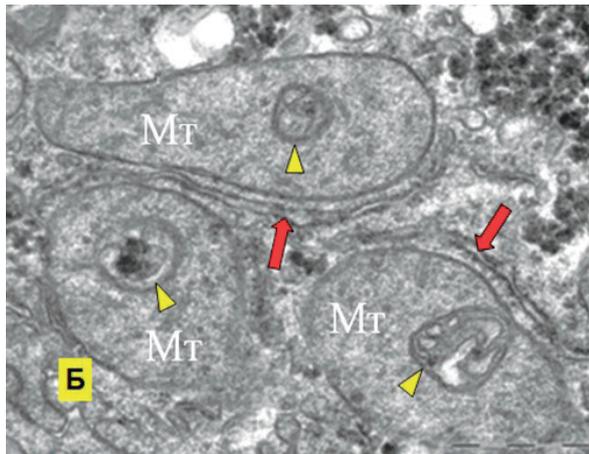


Рисунок 24. – Б: кластер сферических МХ (Mt) с полной потерей крист и аморфным матриксом (митопатия). Сферы внутри МХ обозначены желтыми наконечниками стрел. Изолирующие мембраны (фагофоры), участвующие в образовании аутофагосом, обозначены красными стрелками. $\times 50\,000$

HCV индуцирует апоптоз гепатоцита через митохондриально-опосредованный механизм путем повышенного накопления проапоптотического белка Вах на МХ, снижения трансмембранного потенциала на внутренней мембране и набухания органеллы. В результате высвобождается цитохром С и происходит активация каспазы 3 [40].

Выход цитохрома С из МХ может происходить в результате двух разных процессов. Один из них связан с увеличением объема (набуханием) матрикса МХ и разрывом наружной мембраны под действием давления со стороны внутренней мембраны, площадь которой значительно больше, чем площадь мембраны наружной. Вторая причина связана с набуханием и увеличением ионной проницаемости внутренней мембраны МХ и гидролизом фосфолипидов эндогенной фосфолипазой А2.

Причиной набухания МХ является перекисидация липидов мембран, приводящая к окислению тиоловых групп белков [41]. Это «перекисное» набухание (swelling) увеличивает проницаемость внутренних мембран как для катионов, так и для анионов, что приводит к входу воды в матрикс вследствие осмотического давления белков матрикса [42].

Образование пор во внешней мембране, не связанное с набуханием матрикса, обусловлено в основном белком Вах. Возможность образования пор в наружной мембране олигомерами белка Вах показана на опытах с протеолипосомами, в которых был установлен выход цитохрома С из протеолипосом, состоящих из Вах и фосфолипида. Антиапоптотический белок того же семейства Bcl-2 тормозит этот процесс [43].

Набухание МХ нередко приводило сначала к разрыву наружной, а затем и внутренней мембраны (рис. 25, 26).

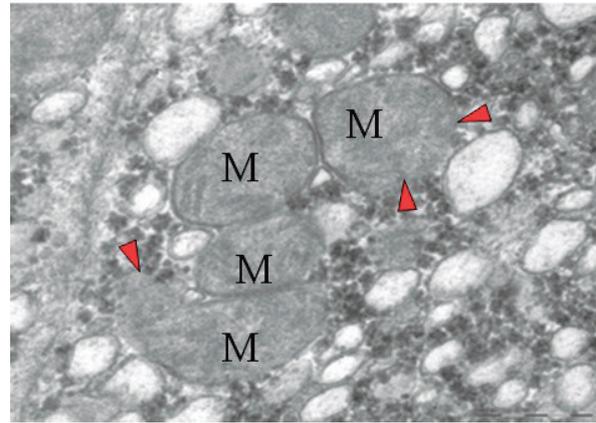


Рисунок 25. – Кластер МХ с разрушенными кристами и мембранами (красные наконечники стрелок). $\times 50\,000$

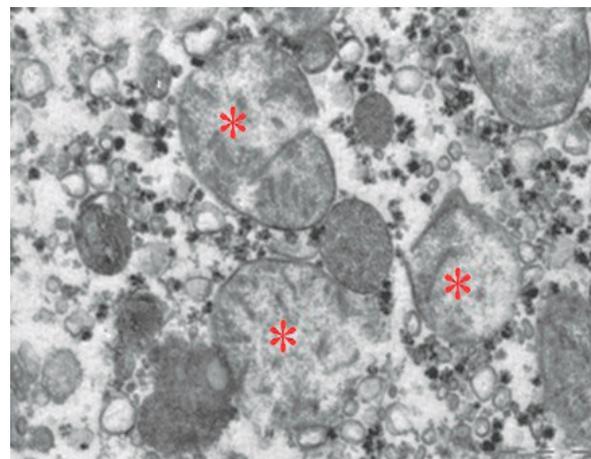


Рисунок 26. – Разрушение внутренней и наружной мембран набухших МХ (красные звездочки) с выходом содержимого матрикса в цитозоль. $\times 40\,000$

Нами были изучены инициирующие звенья запуска митохондриального пути апоптоза у 54 ВИЧ-инфицированных пациентов, находящихся на антиретровирусной терапии (АРТ) лекарственными средствами, обладающими побочным гепатотоксическим эффектом (табл. 1).

Таблица 1. – Корреляционный анализ между апоптотическими факторами плазмы крови ВИЧ-инфицированных пациентов, находящихся на АРТ

Фактор апоптоза	Вах	Цитохром с	Bcl-2
Вах	1,00	0,06	0,49*
Цитохром с	0,06	1,00	-0,03
Bcl-2	0,49*	-0,03	1,00

Примечание – * – $p < 0,05$ по t критерию Стьюдента

При АРТ установлена тесная положительная взаимосвязь между антагонистами митохондриального пути апоптоза Вах и Bcl-2 ($R=0,49$, $p < 0,05$), исчезающая при развитии гепатотоксичности вследствие АРТ, что, вероятно, указывает на запуск апоптоза и митохондриальной дис-

функции при лекарственном поражении печени на фоне АРТ ВИЧ-инфекции [40].

Наиболее изученный процесс – макроаутофагия, при которой происходит деградация крупных органелл клетки и крупных белковых агрегатов через строго регулируемый процесс, начинающийся с выделения и поглощения цитоплазматических компонентов двухслойной липидной мембраной, образующей аутофагосому (рис. 27, 28).

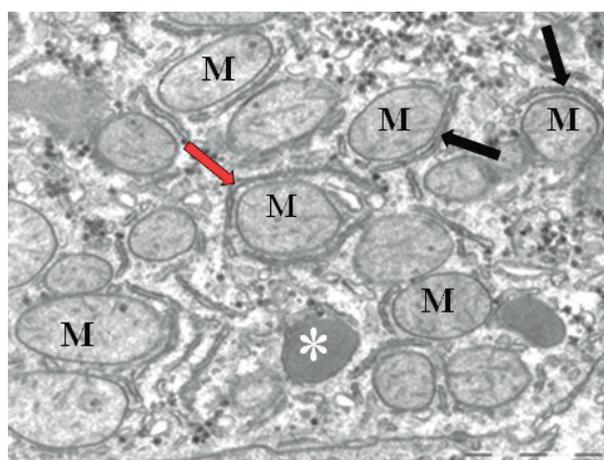


Рисунок 27. – Сформированная изолирующая мембрана, окружающая нефункционирующую МХ, обозначена красной стрелкой; формирующиеся – черной; лизосома – звездочкой. $\times 30\ 000$

Выводы

Диапазон структурных характеристик МХ гепатоцитов при ХГС настолько велик, что затрудняет выделить специфические признаки, характерные только для HCV-этиологии поражения печени. Тем не менее, изучение структуры МХ, их распределения, изменений в гепатоцитах актуально, поскольку позволяет более детально

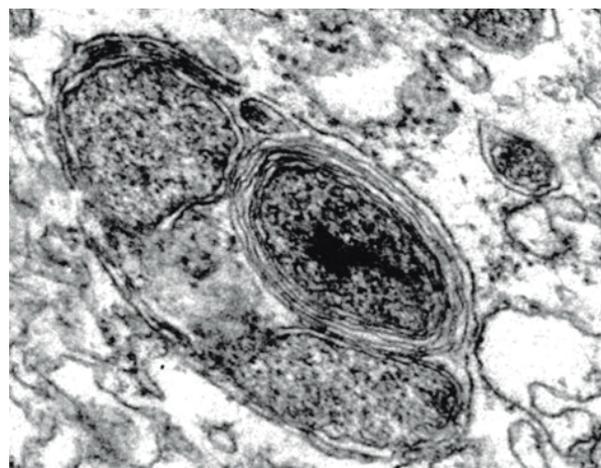


Рисунок 28. – Аутомитофагосома (нарушение организации внутренней структуры нескольких МХ). $\times 30\ 000$

судить о предполагаемых причинах, характере и степени поражения печёночной ткани. Белки HCV тормозят процесс деления МХ, сопровождающегося образованием крупных поврежденных и быстро разрушающихся органелл. Снижение количества МХ, транслоцированных в перинуклеарное пространство цитоплазмы, замедляет апоптоз гепатоцита и способствует персистенции HCV-инфекции. Визуализация МХ в биоптате печени, распределение их в цитоплазме гепатоцита, количество и вариабельность – важные признаки нарушения функционального состояния печени в условиях вирусного поражения.

Из всех исследованных модификаций осмиевого фиксатора преимущества перед существующими реагентами получены при использовании осмиевого фиксатора с добавлением дихромата калия, что позволило повысить контрастность внеклеточного матрикса, провести дифференцировку клеточных популяций в печени и выявить гепатоциты в состоянии апоптоза.

References

- Scheffler IE. Mitochondria. New York: Wiley-Liss; 1999. 480 p.
- Yoshimitsu K, Hiromi N. Intra- and Intercellular Quality Control Mechanisms of Mitochondria. *Cells*. 2017;7(1):1. doi: 10.3390/cells7010001.
- Nelson N, Schatz G. Energy-dependent processing of cytoplasmically made precursors to mitochondrial proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979;76(9):4365-4369.
- Van der Bliek AM, Sedensky MM, Morgan PG. Cell Biology of the Mitochondrion. *Genetics*. 2017;207(3):843-871. doi: 10.1534/genetics.117.300262.
- Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017;482:426-431. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.088.
- Kiriyma Y, Nochi H. Intra- and Intercellular Quality Control Mechanisms of Mitochondria. *Cells*. 2018;7(1):1.
- Lyu BN, Lyu MB, Ismailov BI. Rol mitohondrij v razvitii i regulyacii urovnya oksilitel'nogo stressa v norme, pri kletochnyh patologiyah i reversii opuholevyh kletok. *Advances in Modern Biology*. 2006;126(4):388-398. (Russian).
- Yoshimitsu K, Hiromi N. The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 2015;16(11):26797-26812.
- Pan D, Lindau C, Lagies S, Wiedemann N, Kammerer B. Metabolic profiling of isolated mitochondria and cytoplasm reveals compartment-specific metabolic responses. *Metabolomics*. 2018;14(5):59. doi: 10.1007/s11306-018-1352-x.
- Kim SJ, Syed GH, Khan M, Chiu WW, Sohail MA, Gish RG, Siddiqui A. Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111(17):6413-6418. doi: 10.1073/pnas.1321114111.
- Chan DC. Mitochondria: Dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*. 2006;125:1241-1252. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.010.
- Kurbat MN, Tsyrunov VM, Kondratovich IA. Gepatotoksichnost startovoj skhemy antiretrovirusnoj terapii VICH-infekcii. *Medicinskaja panorama [Medical panorama]*. 2015;1:3-6. (Russian).
- Piccoli C, Scrima R, Quarato G, D'Aprile A, Ripoli M, Lecce

- L, Boffoli D, Moradpour D, Capitanio N. Hepatitis C virus protein expression causes calcium-mediated mitochondrial bioenergetic dysfunction and nitro-oxidative stress. *Hepatology*. 2007;46:58-65. doi: 10.1002/hep.21679.
14. Quarato G, Scrima R, Agriesti F, Moradpour D, Capitanio N, Piccoli C. Targeting mitochondria in the infection strategy of the hepatitis C virus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013;45:156-166. doi: 10.1016/j.biocel.2012.06.008.
 15. Wang T, Weinman SA. Interactions between Hepatitis C Virus and Mitochondria: Impact on Pathogenesis and Innate Immunity. *Curr. Pathobiol. Rep.* 2013;1(3):179-187.
 16. Sato T, Takagi I. An electron microscopic study of specimen-fixed for longer periods in phosphate buffered formalin. *Journal of Electron Microscopy.* 1982;31(4):423-428. doi: 10.1093/oxfordjournals.jmicro.a050388.
 17. Andreev VP, Matievskaya NV, Tsyrukunov VM, Khombak VV, inventors. Method for fixing liver biopsy specimens. BY patent 20209. 2016 Ijun 30. (Russian).
 18. Glauert RH. Araldite as embedding medium for electron microscopy. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology.* 1958;4:409-414.
 19. Millonig GA. Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation. *Journal of Applied Physics.* 1961;32:1637-1643.
 20. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology.* 1958;4:475-478.
 21. Glauert AM, editor. Practical Methods in Electron Microscopy. Vol. 3, pt. 1, Glauert AM. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. New York: American Elsevier; 1975. 207 p.
 22. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1963;17(1):208-212.
 23. Schaff Z, Lapis K, Andre J. Study of the tridimensional structure of intramitochondrial crystalline inclusions. *J. Microscopie.* 1974;20:259-264.
 24. Serov VV, Lapis K, Sekamova S, Beketova TP; USSR Academy of Medical Sciences. Morfologicheskaja diagnostika zabollevanij pecheni [Morphological diagnosis of liver diseases]. Moscow: Meditsina; 1989. 336 p. (Russian).
 25. Riede U, Sandritter W, Mittermayer C. Circulatory shock: a review. *Pathology.* 1981;13(2):299-311.
 26. Ripoli M, D'Aprile A, Quarato G, Sarasin-Filipowicz M, Gouttenoire J, Scrima R, Cela O, Boffoli D, Heim MH, Moradpour D, Capitanio N, Piccoli C. Hepatitis C Virus-linked mitochondrial dysfunction promotes hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated glycolytic adaptation. *J. Virol.* 2010;84(1):647-660. doi: 10.1128/JVI.00769-09.
 27. Siavoshian S, Abraham JD, Thumann C, Kienny MP, Schuster C. Hepatitis C Virus Core, NS3, NS5A, NS5B Proteins Induce Apoptosis in Mature Dendritic Cells. *J. Med. Virol.* 2005;75(3):402-411. doi: 10.1002/jmv.20283.
 28. Brault C, Levy PL, Bartosch B. Hepatitis C virus-induced mitochondrial dysfunctions. *Viruses.* 2013;5(3):954-980. doi: 10.3390/v5030954.
 29. Ding WX, Li M, Biazik JM, Morgan DG, Guo F, Ni HM, Goheen M, Eskelinen EL, Yin XM. Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure. *J. Biol. Chem.* 2012;287(50):42373-42378. doi: 10.1074/jbc.M112.413674.
 30. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010;11(12):872-884. doi: 10.1038/nrm3013.
 31. Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell.* 2006;125(7):1241-1252. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.010.
 32. Fujioka H, Tandler B, Hoppel CL. Mitochondrial division in rat cardiomyocytes: an electron microscope study. *Anat. Rec. (Hoboken).* 2012;295(9):1455-1461. doi: 10.1002/ar.22523.
 33. Fujioka H, Tandler B, Consolo MC, Karnik P. Division of Mitochondria in Cultured Human Fibroblasts. *Microsc. Res. Tech.* 2013;76(12):1213-1216. doi: 10.1002/jemt.22287.
 34. Ding WX, Yin XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol. Chem.* 2012;393(7):547-564. doi: 10.1515/hsz-2012-0119.
 35. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell.* 2011;146(5):682-695. doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.030.
 36. Polla BS, Banzet N, Dall AJ, Patrick AA, Vignola M. Les mitochondries, Carrefour entre vie et mort cellulaire : rôles des protéines de stress et conséquences sur l'inflammation. *Med. Sci.* 1998;14(1):18-25. (French).
 37. Benali-Furet NL, Chami M, Houel L, De Giorgi F, Vernejoul F, Lagorce D, Buscail L, Bartenschlager R, Ichas F, Rizzuto R, Paterlini-Bréchet P. Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene.* 2005;24(31):4921-4933. doi: 10.1038/sj.onc.1208673.
 38. Giacomello M, Pellegrini L. The coming of age of the mitochondria-ER contact: a matter of thickness. *Cell Death Differ.* 2016;23(9):1417-1427. doi: 10.1038/cdd.2016.52.
 39. Pupyshch AB. Reparativnaja autofagija i autofagovaja gibel kletki. Funkcionalnye i reguljatornye aspekty [Reparative autophagy and autophagy death of cells. Functional and regulatory aspects]. *Tsitologija [Cytology]*. 2014;56(3):179-189. (Russian).
 40. Kurbat MN, Tsyrukunov VM. Vzaimosvjaz mezdu proapopticheskim faktorami mitohondrialnogo zvena apoptoza pri lekarstvennom gepatite. In: Zharko VI, editor. *Dostizhenija medicinskoj nauki Belarusi: recenziruemyj nauchno-prakticheskij ezhegodnik [Accomplishments of Medical Science in Belarus]*. Minsk: GU RNMB; 2016. [Internet]. Available from: http://med.by/dmn/book.php?book=16-5_4. (Russian).
 41. Ivashkin VT. Mekhanizmy immunnnoj tolerantnosti i patologii pecheni. *Rossijskij Zhurnal Gastroenterologii, Gepatologii, Koloproktologii [The Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology]*. 2009;19(2):2-13. (Russian).
 42. Crow MT. Hypoxia, BNip3 proteins, and the mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ. Res.* 2002;91(3):183-185.
 43. Moyle G. Mitochondrial toxicity: myths and facts. *J. HIV Ther.* 2004;9(2):45-47.

Поступила: 29.08.2018

Принята к печати: 18.10.2018