

Badania morfometryczne mitochondriów kardiomiocytów dzieci z wrodzonymi wadami strukturalnymi serca

Morphometric investigations of cardiomyocyte mitochondria from children with structural congenital heart malformations



Dariusz Tosik¹, Jacek Moll², Jadwiga Moll³, Andrzej Kulig⁴, Hieronim Bartel¹

¹Zakład Histologii i Ultrastruktury Tkanki, UM, Łódź

²Klinika Kardiologii, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

³Klinika Kardiologii, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

⁴Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

Kardiologia i Torakochirurgia Polska 2009; 6 (1): 60–62

Streszczenie

Wstęp: Nieprawidłowa, zależna od różnych czynników, funkcja mitochondriów jest jedną z kluczowych dysfunkcji spotykanych w różnego typu schorzeniach kardiologicznych. W niniejszej pracy prezentujemy wybrane parametry mitochondriów uzyskane na podstawie analizy morfometrycznej kardiomiocytów dzieci z wrodzonymi wadami serca.

Cel pracy: Ocena ilościowa parametrów morfologiczno-czynnościowych mitochondriów kardiomiocytów w przypadku różnych rodzajów wad serca.

Materiał i metody: Fragmenty tkanek uzyskiwano w trakcie kardiologicznej korekcji trzech typów wad wrodzonych serca: ubytku międzykomorowego (VSD), tetralogii Fallota (TOF) i zespołu hipoplazji lewego serca (HLHS). Grupę odniesienia stanowili pacjenci z grupy VSD. Wiek pacjentów wahał się w granicach od 11 dni do 4 lat. Elektronogramy mitochondriów poddano analizie morfometrycznej przy użyciu systemu analizy obrazu ImageJ ver. 1.33p. Analiza obejmowała wykonanie pomiarów obwodu przekroju mitochondrium (L_{om}), powierzchni przekroju mitochondrium (P_{mit}), długości błony wewnętrznej (L_{im}) i powierzchni przedziału wewnętrznego (P_{ic}). Następnie obliczono następujące parametry i współczynniki: powierzchnię przedziału zewnętrznego ($P_{oc}=P_{mit}-P_{ic}$), objętość względną przedziału zewnętrznego ($V_{oc}=P_{oc}/P_{mit}$) i współczynnik udziału przedziału wewnętrznego na jednostkę powierzchni błony wewnętrznej ($E_{ic}=P_{ic}/L_{im}$).

Wyniki: Uzyskane wyniki wskazują, że w przypadku wad bezsiniących mitochondria znajdują się w stanie morfologiczno-energetycznym zbliżonym do skondensowanego, który charakteryzuje się wysokim zużyciem tlenu i niskim poziomem ATP.

Wnioski: Powiązanie parametrów morfometrycznych z charakterem zaburzeń hemodynamicznych w przypadku sinicznych wad serca wskazuje, że zmiana stanu czynnościowego mitochondriów jest wynikiem zarówno hipoksji, jak i przeciążenia mechanicznego.

Abstract

Background: Abnormal function of the mitochondria, which depends on different factors, is one of the main dysfunctions observed in different types of cardiological illnesses. We present selected parameters of mitochondria obtained during morphometric analysis of cardiomyocytes of children with different types of congenital heart malformations.

Aim: Quantitative evaluation of morphological and functional parameters of mitochondria of cardiomyocytes in various types of congenital heart malformations.

Material and Methods: Tissue blocks were obtained during surgical correction of three types of heart congenital malformations: ventricular septal defect (VSD), tetralogy of Fallot (TOF) and hypoplastic left heart syndrome (HLHS). The reference group was made up of VSD patients. The age of the patients varied from 11 days to 4 years. Electronograms of mitochondria were analyzed using the image analysis system ImageJ ver. 1.33p. During analysis perimeter and area of mitochondrial profiles, length of the inner membrane and area of the inner compartment were measured. According to this, area of the outer compartment, relative volume of the outer compartment, and ratio of inner compartment volume to inner membrane area were calculated.

Results: Obtained results indicate that in the case of cyanotic heart malformations mitochondria are approximately in an orthodox steady state which is characterized by high oxygen consumption and low ATP level.

Conclusions: Connection of morphometric parameters with the nature of haemodynamic dysfunctions in the case of non-cyanotic heart malformations indicates that change of the mitochondrial steady-state is a result of both hypoxia and mechanical overloading

Key words: congenital heart malformations, mitochondria, morphometry, ultrastructure.

Adres do korespondencji: dr n. med. Dariusz Tosik, Zakład Histologii i Ultrastruktury Tkanki, ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź, tel./faks +48 42 632 40 87, e-mail: tosik@achilles.wam.lodz.pl

Słowa kluczowe: wady wrodzone serca, mitochondria, morfometria, ultrastruktura.

Wstęp

Rocznie w Polsce rodzi się około 4 tysięcy dzieci z wadami wrodzonymi serca.

Aż 20% z nich wymaga leczenia w pierwszych dniach życia, ze względu na przewodozależny typ krążenia. W Polsce w ciągu roku wykonuje się u dzieci około 3 tysięcy operacji kardiologicznych i około 700 kardiologicznych zabiegów interwencyjnych.

Jedną z charakterystycznych patologii obserwowanych w kardiomiocytach w przypadku strukturalnych wad serca są różnego rodzaju zmiany wyglądu mitochondriów. Polegają one na zmianie kształtu z wydłużonego na owalny lub okrągły, zmniejszeniu gęstości elektronowej macierzy, jej wakuolizacji, poszerzeniu grzebieni błony wewnętrznej oraz jej strukturalnych uszkodzeniach.

Uszkodzenia białek łańcucha oddechowego na skutek mutacji mitochondrialnego lub jądrowego DNA, hipoksja, reaktywne formy tlenu czy wreszcie przeciążenie mechaniczne mogą wpływać na funkcję mitochondriów, co w konsekwencji prowadzi do zmian ich morfologii.

Cel pracy

Celem prezentowanej pracy było zbadanie, na ile różnice w hemodynamice mięśnia sercowego w różnego typu wadach serca wpływają na stan morfologiczno-czynnościowy mitochondriów kardiomiocytów oraz znalezienie parametru morfometrycznego, który najlepiej te zmiany charakteryzuje.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na fragmentach mięśnia sercowego pobranych do diagnostyki histopatologicznej od dzieci w wieku od 11 dni do 4 lat, w trakcie chirurgicznej korekcji wad wrodzonych serca. Grupy badawcze stanowiły tkanki pochodzące z:

1. Bezsiniowych przecieków międzykomorowych (ang. *ventricular septal defekt* – VSD) (n=4).
2. Tetralogii Fallota (ang. *tetralogy of Fallot* – TOF) (n=6).
3. Zespołu hipoplazji lewego serca (ang. *hypoplastic left heart syndrome* – HLHS) (n=5).

Tkanki utrwalano bezpośrednio po pobraniu w 5-procentowym aldehydzie glutarowym w temperaturze 4°C. Preparaty były zatapiane w Eponie, a następnie krojone na skrawki o grubości 80 nm. Tkanki kontrastowano cytrynianem ołowiu i octanem uranylu w automacie Ultrasteiner LKB. Preparaty oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym Philips EM301 przy powiększeniu 3400×. Drobny pól do analizy morfometrycznej odbywał się w sposób systematyczny. Fotografowano lewy, górny kwadrant oczka siatki, w którym znajdowały się mitochondria [1, 2].

Analizę morfometryczną wykonano systemem analizy obrazu typu open ImageJ ver. 1.33p. Elektronogramy o powiększeniu końcowym 85 000× skanowano z rozdzielczością

600 dpi. Etap cyfrowej obróbki obrazu obejmował kalibrację systemu, filtrację, interaktywne progowanie, przetwarzanie uzyskanego obrazu binarnego, ręczną korekcję obrazu binarnego oraz identyfikację obiektów podlegających pomiarowi [2]. W każdej grupie wykonano pomiary 212–243 profili mitochondriów, w których nie obserwowano cech uszkodzenia (wakuolizacja macierzy, brak ciągłości błon). Dokonano pomiaru następujących parametrów mitochondriów:

1. Obwodu przekroju mitochondrium (L_{om}).
2. Powierzchni przekroju mitochondrium (P_{mit}).
3. Długości błony wewnętrznej (L_{im}).
4. Powierzchni przedziału wewnętrznego (P_{ic}).

Na ich podstawie wyliczono następujące parametry i współczynniki:

1. Powierzchnię przedziału zewnętrznego ($P_{oc}=P_{mit}-P_{ic}$).
2. Objętość względną przedziału zewnętrznego ($V_{oc}=P_{oc}/P_{mit}$).
3. Współczynnik udziału przedziału wewnętrznego na jednostkę powierzchni błony wewnętrznej ($E_{ic}=P_{ic}/L_{im}$).

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie za pomocą testu U przy poziomie istotności $p<0,01$ [3].

Wyniki

Objętość względną przedziału zewnętrznego (V_{oc}) nie różniła się w sposób istotny statystycznie pomiędzy grupami. Współczynnik udziału przedziału zewnętrznego (E_{oc}) był znamienne niższy w grupie VSD, przy poziomie istotności $p<0,01$. Ten sam współczynnik w grupach TOF i HLHS wykazywał różnicę przy poziomie istotności $p<0,05$. Powierzchnia przedziału wewnętrznego była znamienne statystycznie niższa w grupie VSD, natomiast nie różniła się znamienne pomiędzy grupami TOF i HLHS. W przypadku tego parametru zwraca uwagę bardzo duże (powyżej 30%) odchylenie standardowe obserwowane we wszystkich grupach. Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli I.

Dyskusja

Stan czynnościowy mitochondriów jest ściśle powiązany z ich morfologią. Pionierskie badania *in vitro* Chance'a i Hackenbrocka pozwoliły na wyodrębnienie różnych sta-

Tab. I. Parametry morfometryczne mitochondriów w wybranych strukturalnych wadach serca

	VSD	TOF	HLHS
P_{ic}	0,31±0,19*	2,05±0,64	2,44±0,7
V_{oc}	29±6	26±3	27±9
E_{ic}	6,12±0,87*	9,8±0,34**	11,37±0,47**

* $p<0,01$

** $p<0,05$

nów czynnościowo-metabolicznych mitochondriów. Zostały one potwierdzone badaniami *in vivo* [4–10]. Chance i Hackenbrock wyróżnili dwa skrajne stany metaboliczno-morfologiczne mitochondriów: ortodoksyjny (stan IV) i skondensowany (stan I).

Mitochondria w stanie ortodoksyjnym charakteryzują się metabolicznie niskim zużyciem tlenu oraz niskim poziomem oksydatywnej fosforylacji. Morfologicznie charakteryzują się poszerzonym przedziałem wewnętrznym, rozrzedzoną macierzą matą, liczbą grzebieni mitochondrialnych. Mitochondria skondensowane charakteryzują się wysoką aktywnością metaboliczną, czego wykładnikiem morfologicznym jest zmniejszenie objętości i zagęszczenie macierzy, duża liczba grzebieni błony wewnętrznej oraz poszerzenie przedziału zewnętrznego.

Uzyskane wyniki wskazują, że mitochondria kardiomiocytów z grup TOF i HLHS charakteryzują się poszerzeniem przedziału wewnętrznego w stosunku do grupy VSD. Wskazują na to wartości zarówno bezwzględnej powierzchni przedziału wewnętrznego (P_{ic}), jak i wartość współczynnika E_{ic} . Wydaje się, że ten ostatni parametr lepiej opisuje stan morfologiczno-czynnościowy mitochondriów, gdyż uwzględnia dwa czynniki: powierzchnię przedziału wewnętrznego i długość błony wewnętrznej. Tym samym pozwala na dokładniejsze zróżnicowanie badanych grup. Również różnice bezwzględnej powierzchni profilu mitochondrium, które tworzą zróżnicowaną populację, mają stosunkowo niewielki wpływ na jego wartość, o czym może świadczyć wartość odchylenia standardowego.

Zmniejszenie wartości współczynnika w grupie VSD wskazuje na zwężenie przedziału wewnętrznego przy jednoczesnym zwiększeniu długości błony wewnętrznej, co jest charakterystyczne dla przesunięcia stanu energetycznego mitochondriów w kierunku skondensowanego. Odwrotna sytuacja ma miejsce w przypadku grup TOF i HLHS. Wzrost wartości E_{ic} wraz z widocznym zmniejszeniem gęstości elektronowej macierzy stanowią wykładniki przesunięcia

stanu energetycznego mitochondriów w kierunku ortodoksyjnego.

Wydaje się, że przyczyn tego zjawiska należy upatrywać w braku istotnych uszkodzeń strukturalnych elementów mięśnia sercowego w grupie VSD. Zużycie ATP powinno być w tym przypadku wyższe w porównaniu z mięśniem uszkodzonym i w związku z tym częściowo nieczynnym.

W przypadku wad sinicznych uogólniona hipoksja prowadzi do zahamowania oksydatywnej fosforylacji, co z kolei znajduje odzwierciedlenie w zmianie morfologii mitochondriów w kierunku stanu ortodoksyjnego.

Praca finansowana z funduszy grantu KBN nr 0714/P05/2005/28.

Piśmiennictwo

1. Weibel ER. Stereological methods. vol. 1. 1979, Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco.
2. Zieliński KW, Strzelecki M. Komputerowa analiza obrazu biometrycznego. PWN 2002, Warszawa, Łódź.
3. Stanisław A. Przystępny kurs statystyki. StatSoft Polska, Kraków 1998.
4. Cieciora L, Kidawa Z, Jaszczuk-Jarosz B, Trznadel K, Konopacki J. Ultrastructural markers of tubular transport in experimental diabetes insipidus. Proc Eur Dial Transplant Assoc Eur Ren Assoc 1985; 21: 732-737.
5. Guarriero-Bobyleva V, Ceccarelli-Stanzani D, Masini A, Muscatello U. The relation between structural and metabolic steady-states in isolated rat liver mitochondria. A study of the functional significance. J Submicrosc Cytol 1982; 14: 461-470.
6. Cieciora L, Klitończyk W, Rydyński K, Harażna J. Studies on metabolic steady states of mitochondria in selected organs of the rat. Acta Med Pol 1977; 18: 297-298.
7. Cieciora L, Rydyński K, Klitończyk W, Harażna J. Stereology of mitochondria in different metabolic steady states. Acta Med Pol 1977; 18: 291-292.
8. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in the oxidative phosphorylation. III. The steady states. J Biol Chem 1955; 217: 409-427.
9. Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. J Cell Biol 1966; 30: 269-297.
10. Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. J Cell Biol 1968; 37: 345-369.