

УДК 616-008.853.3+612.769

## Морфологические изменения митохондрий стромальных клеток костного мозга мышей, подвергнутых моделированной гипокинезии

Садовников Ф.А.<sup>1</sup>, Полякова М.В.<sup>1</sup>, Астахова А.И.<sup>1,2</sup>, Алчинова И.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»  
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»  
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Особую роль в развитии иммобилизационно-опосредованных нарушений костной ткани играет костный мозг, депонирующий популяции прогениторных клеток, в частности остеогенных, важным элементом физиологии которых являются митохондрии. В свою очередь, изменение активности митохондрий определяется не только биохимическими процессами, но и их структурной динамикой.

**Цель работы:** количественное определение изменений в морфологии митохондрий культуры стромальных клеток костного мозга после воздействия гипокинезии на мышей.

**Материалы и методы.** Самцов мышей ICR весом  $23,0 \pm 1,5$  г 7 дней подвергали воздействию моделированной гипокинезии с последующим выделением клеток костного мозга из бедренных костей. Первичную культуру выращивали в стандартных условиях на полной питательной среде. На 6-й день клетки пересевали и через 24 ч проводили морфологическую оценку митохондриома с помощью метода лазерной сканирующей конфокальной флуоресцентной микроскопии (ЛСКМ) с последующей математической обработкой и анализом 3D-изображений.

**Результаты.** Суммарный объем и площадь поверхности митохондрий клеток группы «Гипокинезия» были меньше в 4 и 1,73 раза, соответственно, по сравнению с «Контролем». По объему сами клетки в группе «Гипокинезия» были в 3,26 раз меньше, чем в культуре от контрольных животных. Количественную оценку морфологических различий митохондриома проводили с помощью вычисления отношения суммарной площади поверхности всех митохондрий клетки к их суммарному объему. Этот параметр в клетках мышей из группы «Гипокинезия» превосходил таковой в «Контроле» в 2,3 раза.

**Заключение.** После 7 суток ограничения подвижности животных наблюдали изменение митохондриальной морфологии в стромальных клетках костного мозга. Полученный численный показатель разницы говорит о более высокой фрагментированности или извилистости митохондриальной сети в клетках группы «Гипокинезия».

**Ключевые слова:** стромальные клетки костного мозга; гипокинезия; митохондриальная динамика; лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛСКМ).

**Для цитирования:** Садовников Ф.А., Полякова М.В., Астахова А.И., Алчинова И.Б. Морфологические изменения митохондрий стромальных клеток костного мозга мышей, подвергнутых моделированной гипокинезии. *Патогенез.* 2024; 22(2): 84-88.

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2024.02.84-88

**Для корреспонденции:** Садовников Федор Алексеевич, e-mail: fedor.sadovnikov.2000@yandex.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания № FGFGU-2022-0010 «Оценка адаптивных реакций организма на действие физико-химических и экологических факторов среды».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 06.06.2024.

## Morphological changes in the mitochondria of bone marrow stromal cells of mice subjected to simulated hypokinesia

Sadovnikov F.A.<sup>1</sup>, Polyakova M.V.<sup>1</sup>, Astakhova A.I.<sup>1,2</sup>, Alchinova I.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology  
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> Patrice Lumumba RUDN University  
Miklukho-Maklaya Str. 6, Moscow 117198, Russian Federation

Bone marrow, which harbors populations of different progenitor cells, in particular osteogenic cells, plays a special role in the development of immobilization-mediated bone disorders. Mitochondria are a vital component in the physiology of these cells. Changes in mitochondrial activity are determined not only by biochemical processes but also by their structural dynamics.

**The aim** of this study was to quantitatively assess changes in the morphology of mitochondria in a culture of bone marrow stromal cells after exposure to hypokinesia in mice.

**Materials and methods.** Male ICR mice weighing  $23,0 \pm 1,5$  g were subjected to simulated hypokinesia for 7 days, followed by isolation of bone marrow cells from the femurs. The primary culture was grown under standard conditions on a complete nutrient medium. On day 6, the cells were subcultured and 24 hours later, the morphological assessment of the mitochondria was carried out using the laser scanning confocal fluorescent microscopy (LSCM) technique followed by mathematical processing and analysis of 3D-images.

**Results.** The total volume and surface area of mitochondria in cells in the «Hypokinesia» group were 4 and 1,73 times smaller, respectively, compared to the «Control» group. In terms of volume, the cells themselves in the «Hypokinesia» group were 3,26 times smaller than in «Control». A quantitative assessment of the morphological differences in the mitochondria was carried out by calculating the ratio of the total surface area of all mitochondria in a cell to their total volume. This parameter in the cells of mice from the «Hypokinesia» group exceeded that in the «Control» by 2,3 times.

**Conclusion.** After 7 days of restriction of animal mobility, changes in mitochondrial morphology were observed in bone marrow stromal cells. The resulting numerical difference indicates a higher fragmentation or tortuosity of the mitochondrial network in the cells of the «Hypokinesia» group.

**Key words:** bone marrow stromal cells; hypokinesia; mitochondrial dynamics; laser scanning confocal fluorescent microscopy.

**For citation:** Sadovnikov F.A., Polyakova M.V., Astakhova A.I., Alchinova I.B. [Morphological changes in the mitochondria of bone marrow stromal cells of mice subjected to simulated hypokinesia]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2024; 22(2): 84-88. (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2024.02.84-88

**For correspondence:** Sadovnikov Fedor Alekseevich, e-mail: fedor.sadovnikov.2000@yandex.ru

**Financing.** The work was carried out within the framework of the state assignment № FGFU-2022-0010 «Assessment of adaptive reactions of the organism to the action of physico-chemical and ecological environmental factors».

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 06.06.2024.

## Введение

Длительная опорная разгрузка и сниженная подвижность тела, возникающие в условиях космического полёта, а также при лечении сложных заболеваний и продолжительной реабилитации, влекут за собой ряд негативных изменений в структурных элементах скелетной ткани. Особую роль в этих процессах играет костный мозг (КМ), депонирующий популяции остеогенных прогениторных клеток. Их функциональный статус может меняться при различных формах ограничения подвижности, что было неоднократно показано в исследованиях [1].

Важным элементом в физиологии любых, в том числе стромальных, клеток являются митохондрии. Исследования последних лет показывают, что изменение активности митохондрий определяется не только биохимическими процессами, но и их структурной динамикой [2, 3]. Поэтому набирает популярность морфологический подход к оценке митохондриома. Долгое время возможность визуализировать внутриклеточные структуры была крайне ограничена и представлена в основном электронной микроскопией. Настоящим прорывом в этой области стало появление лазерной сканирующей конфокальной флуоресцентной микроскопии (ЛСКМ), позволяющей прижизненно анализировать структурные изменения в органоидах клетки с субмикронным разрешением во всем объеме клетки [4].

**Целью работы** стало количественное определение изменений в морфологии митохондрий культуры стромальных клеток костного мозга (СККМ) после воздействия гипокинезии на мышей.

## Материалы и методы исследования

Работа проведена на самцах мышей линии ICR весом  $23,0 \pm 5$  г. Были выделены две группы: «Контроль» – животные, находившиеся в свободном поведении в стандартных условиях вивария ( $n = 5$ ); «Гипокинезия» – животных на 7 дней помещали в пластико-

вый флакон и фиксировали за хвост для моделирования ограничения подвижности в горизонтальном, естественном для мышей положении ( $n = 5$ ).

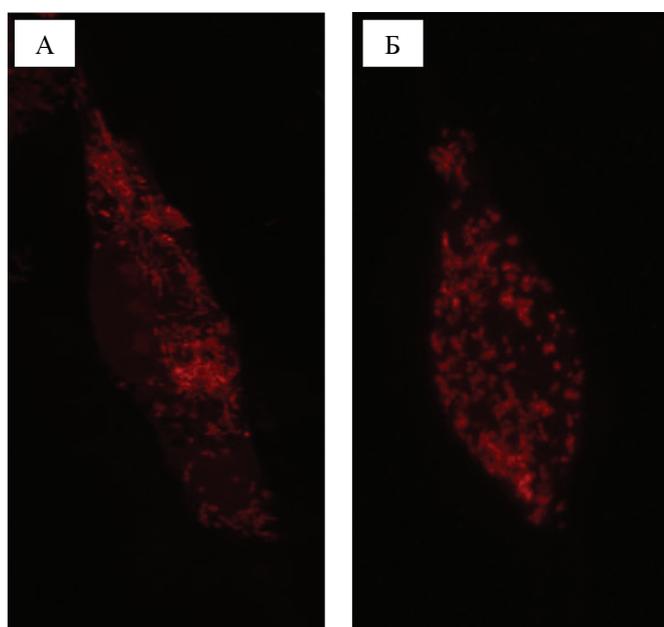
После окончания моделирования гипокинезии, животных выводили из эксперимента путём декапитации с последующим выделением бедренных костей и получением из них образцов клеток КМ по стандартной методике [5]. Первичную культуру пластик-адгезивных СККМ выращивали на полной питательной среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия), 10% фетальной бычьей сыворотки («ПанЭко», Россия), 4 мМ аланин-глутамин («ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл пенициллин-стрептомицин, 2,5 мкг/мл амфотерицин В («ПанЭко», Россия), 20 мМ NEPEP (Boehringer Ingelheim, Германия) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

На 6-й день клетки пересеивали в 12-луночную слайд-камеру с покровным стеклом (Sarstadt, Германия) в плотности 8 тыс. кл. на лунку. Через 24 ч клетки промывали в среде для микроскопии FluoroBrite DMEM (Gibco, США) и инкубировали с краской MitoTracker Orange CMTMRos (Thermo Fisher Scientific, США) в конечной концентрации 50 нМ 20 минут при 37°. Морфологическую оценку митохондриома проводили с помощью системы микроскопии сверхвысокого разрешения STED - STEDYCON (Abberior Instruments GmbH, Германия) и FLIM-микроскопии (PicoQuant GmbH, Германия) на базе инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония) в режиме флуоресцентной конфокальной микроскопии (561 нм). После инкубации лунки дважды промывали средой для микроскопии и проводили съёмку одиночных клеток послойно в конфокальном Z-стэк режиме с шагом по оси Z 0,25 мкм (пинхол 1,06 AU). Полученные в ходе съёмки стэки 8-битных изображений обрабатывали с использованием программного пакета FIJI (ImageJ2). Плоские фокальные изображения клеток создавали путем суммирования самых ярких пикселей с каждой фотографии из стэка (совокупности микрофотографий с разным

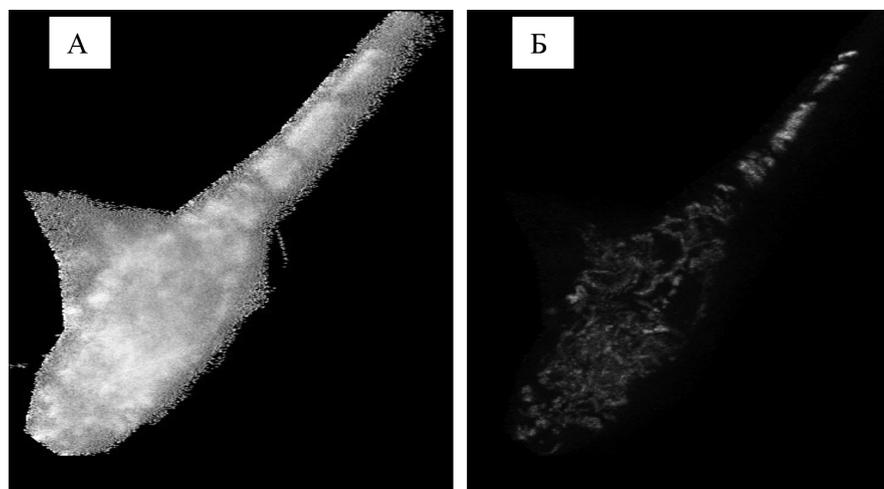
фокусом). Трёхмерные изображения формировали посредством послойного наложения фотографий стэков по контуру клетки. Точки соседних фокальных изображений соединяли по ортогональной оси путем добавления между ними пикселей с интенсивностью свечения, вычисляемой с помощью функции интерполяции.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартного пакета программы «Statistica 8». Использовали *U*-критерий Манна–Уитни. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде медиан с квартилями Me [Q1; Q3].

Работа выполнена после одобрения и под контролем локального Этического комитета ФГБНУ «НИИ-ОПП» (протоколы №1 от 01.02.2023, №2 от 12.03.2024).



**Рис. 1.** Плоские фокальные изображения (100X, Цвет) клеток группы «Контроль» (А) и «Гипокинезия» (Б). Размер области съёмки в мкм: А – 64 × 24; Б – 17 × 35.



**Рис. 2.** 3D-изображения клетки группы «Контроль»: (А) – увеличение интенсивности фонового свечения цитоплазмы; (Б) – наложение микрофотографий стэка за вычетом фонового свечения.

## Результаты исследования

Для оценки состояния митохондрий было проведено сканирование с использованием митотрекера. По описанию производителя данный краситель представляет собой нефлуоресцентное вещество на основе розамина, которое при окислении переходит в флуоресцентную форму. Соответственно, краситель способен окрашивать активные митохондрии в живых клетках. При этом митотрекер чувствителен к SH-группам белков и аминокислот, поэтому на фотографии возникает фоновое свечение в районах цитоплазмы и ядра клетки. Предварительную визуальную оценку митохондрий клеток проводили на плоских фокальных изображениях (**рис. 1**).

Размер клеток оценивали по общему объёму на 3D-изображениях, построенных с увеличенной светимостью всех ненулевых пикселей до максимального значения (**рис. 2, А**). С помощью такого подхода к построению объёмной конструкции клетки фоновое свечение цитоплазмы использовали в качестве контура. Параметры митохондрий оценивали по 3D-изображениям, которые получали с помощью обработанных изображений с удаленным шумом от цитоплазмы (**рис. 2, Б**).

Суммарный объём митохондрий клеток группы «Гипокинезия» был в 4,8 раза меньше этого параметра в клетках группы «Контроль» (**табл. 1**). Суммарная площадь поверхности митохондрий экспериментальной группы также имела тенденцию к снижению по сравнению с показателем контрольной группы (2,2 раза при  $P_U=0,053$ ). Наряду с этим, клетки в группе «Гипокинезия» были в 3,3 раза меньше, чем в культуре от контрольных животных (**табл. 1**).

Мы посчитали, что интегральные различия митохондриальных параметров не являются корректными, так как размеры самих клеток существенно отличаются между группами. Поэтому количественную оценку морфологических различий митохондриома клеток проводили с помощью вычисления отношения суммарной

площади поверхности всех митохондрий клетки к их суммарному объёму. Подобранный относительный параметр в клетках мышей из группы «Гипокинезия» превосходил таковой в «Контроле» в 2,3 раза.

Похожие параметры рассматривали авторы в работе [6], посвященной прижизненному анализу митохондриальной морфологии первичной культуры клеток почек мышей после моделирования ишемии.

### Обсуждение

В процессе изучения морфологии митохондрий наблюдали увеличение степени их извилистости или фрагментированности в культуре СККМ в группе «Гипокинезия» после 7 дней вывешивания животных. Так как созревание и деградация митохондриальной сети являются неразрывной частью всех клеточных процессов, наблюдаемый эффект может возникать по нескольким причинам.

Принято считать, что при клеточном стрессе митохондриальная сеть подвергается разделению, так как митохондрии, потерявшие функциональную активность, вовлекаются в процесс митофагии. При этом, в литературе также описывают гиперслияние митохондрий как процесс нормального регулирования макроаутофагии [2, 7]. В нашей работе наблюдаемая митохондриальная динамика может отражать системную стресс-реакцию сообщества СККМ на иммобилизацию животного и являться частью механизма удаления поврежденных митохондрий.

Однако фрагментированность митохондрия не всегда связана с клеточным стрессом. Существуют работы, которые показывают, что стволовые клетки мезенхимального происхождения могут иметь незрелую митохондриальную сеть (более фрагментированную), что обуславливается особенностями их клеточного метаболизма, а именно превалированием гликолиза над окислительным фосфорилированием на различных стадиях дифференцировки [8].

В исследовании Е.А. Маркиной и др. [9] было зафиксировано снижение остеогенных клеток-предшественников в КМ при опорной разгрузке мышей в рамках моделирования антиортостатической гипокинезии. Однако авторы указывают, что в популяции СККМ пул стволовых клеток оставался неизменным. В таком случае, наблюдаемое в нашей работе увеличение относительного параметра оценки митохондрия в клетках группы «Гипокинезия» может быть связано с изменением соотношения субпопуляций прогениторных СККМ в сторону увеличения доли менее зрелых стволовых клеток. Однако, это предположение требует дальнейшего изучения.

### Заключение

После 7 суток ограничения подвижности животных наблюдали изменение митохондриальной морфологии в культуре стромальных клеток костного мозга. В экспериментальной группе отношение суммарной площади

поверхности митохондрий к суммарному объёму превосходило в 2,3 раза аналогичный параметр в контроле. Численный показатель разницы говорит о более высокой фрагментированности или извилистости митохондриальной сети в клетках экспериментальной группы.

### Список литературы

1. Mazess R.B., Whedon G.D. Immobilization and bone. *Calcif. Tissue Int.* 1983; 35(3): 265–267. DOI: 10.1007/BF02405043
2. Liu J., Gao Z., Liu X. Mitochondrial dysfunction and therapeutic perspectives in osteoporosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024; 15. DOI: 10.3389/fendo.2024.1325317
3. Ren L., Chen X., Chen X., Li J., Cheng B., Xia J. Mitochondrial dynamics: fission and fusion in fate determination of mesenchymal stem cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; 8: 580070. DOI: 10.3389/fcell.2020.580070
4. Мишин А.С., Лукьянов К.А. Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения живых клеток. *Успехи биологической химии*. 2019; 59: 39.
5. Amend S.R., Valkenburg K.C., Pienta K.J. Murine Hind Limb Long Bone Dissection and Bone Marrow Isolation. *J. Vis. Exp.* 2016; (110): 53936. DOI: 10.3791/53936
6. Попков В.А., Плотников Е.Ю., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Силачев Д.Н., Бабенко В.А., Янкаускас С.С., Зоров С.Д., Зоров Д.Б. Количественные подходы к прижизненному анализу морфологии митохондрий. *Цитология*. 2016; 58(9): 699–706.
7. Zemirli N., Morel E., Molino D. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(2): 564. DOI: 10.3390/ijms19020564
8. Тюрин-Кузьмин П.А., Молчанов А.Ю., Чечехин В.И., Иванова А.М., Кулебякин К.Ю. Метаболическая регуляция дифференцировки стволовых клеток млекопитающих. *Биохимия*. 2020; 85(3): 307–323. DOI: 10.31857/S0320972520030021
9. Маркина Е.А., Бобылева П.И., Алексеева О.Ю., Андрианова И.В., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Характеристика прогениторных клеток костного мозга мышей C57BL/6N после 30-суточного антиортостатического вывешивания и 12-часовой реадaptации к опорной нагрузке. *Цитология*. 2019; 61(11): 883–894. DOI: 10.1134/S0041377119110051

### References

1. Mazess R.B., Whedon G.D. Immobilization and bone. *Calcif. Tissue Int.* 1983; 35(3): 265–267. DOI: 10.1007/BF02405043
2. Liu J., Gao Z., Liu X. Mitochondrial dysfunction and therapeutic perspectives in osteoporosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024; 15. DOI: 10.3389/fendo.2024.1325317
3. Ren L., Chen X., Chen X., Li J., Cheng B., Xia J. Mitochondrial dynamics: fission and fusion in fate determination of mesenchymal stem cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; 8: 580070. DOI: 10.3389/fcell.2020.580070
4. Mishin A.S., Lukyanov K.A. [Ultra-high resolution fluorescence microscopy of living cells]. *Uspekhi biologicheskoi khimii [Advances in Biological Chemistry]*. 2019; 59: 39. (in Russian)
5. Amend S.R., Valkenburg K.C., Pienta K.J. Murine Hind Limb Long Bone Dissection and Bone Marrow Isolation. *J. Vis. Exp.* 2016; (110): 53936. DOI: 10.3791/53936
6. Popkov V.A., Plotnikov E.Y., Zorova L.D., Pevzner I.B., Silachev D.N., Babenko V.A., Yankauskas S.S., Zorov S.D., Zorov D.B. [Quantification of mitochondrial morphology in situ]. *Tsitologiya [Cytology]*. 2016; 58(9): 699–706. (in Russian)
7. Zemirli N., Morel E., Molino D. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(2): 564. DOI: 10.3390/ijms19020564
8. Tyurin-Kuzmin P.A., Molchanov A.Yu., Chechekhin V.I., Ivanova A.M., Kulebyakin K.Yu. [Metabolic regulation of mammalian stem cells differentiation]. *Biokhimiya [Biochemistry]*. 2020; 85(3): 307–323. DOI: 10.31857/S0320972520030021 (in Russian)
9. Markina E.A., Bobyleva P.I., Alekseeva O.Y., Andrianova I.V., Andreeva E.R., Buravkova L.B. [Characteristics of Bone Marrow Progenitor Cells of C57BL/6N Mice after 30-Day Hindlimb Suspension and 12-Hour Readaptation to Support Loading]. *Tsitologiya [Cytology]*. 2019; 61(11): 883–894. DOI: 10.1134/S0041377119110051 (in Russian)

---

**Сведения об авторах:**

*Садовников Федор Алексеевич* — младший научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0009-0006-9760-9964>

*Полякова Маргарита Вячеславовна* — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-0517-630X>

*Астахова Анна Ивановна* — кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Центра коллективного пользования научным оборудованием Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; ведущий научный сотрудник НОРЦ Инновационные технологии иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»; <https://orcid.org/0009-0002-1004-2450>

*Алчинова Ирина Борисовна* — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0001-5294-7317>